



FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

O papel do género Staphylococcus no ecossistema oral: persistência, diversidade de espécies e perfil de resistência antimicrobiana

The Role of Staphylococcus genus in the oral ecosystem: persistence, species diversity, and resistance traits

Maeva dos Santos Fonseca

Porto, 2026

Dissertação de candidatura ao grau
de Mestre em Medicina Dentária
pela Faculdade de Medicina Dentária
da Universidade do Porto

“A responsabilidade de ter olhos quando os outros os perderam.”
José Saramago

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Doutora Benedita, expresso o meu profundo agradecimento por todo o apoio, pela confiança em mim depositada e pela orientação constante. A sua visão e exigência foram essenciais para que este trabalho ganhasse forma e substância. Chegar a esta etapa não teria sido, de todo, possível sem si.

À minha coorientadora, Doutora Carolina, agradeço a ajuda indispensável. Levarei para a vida todas as aprendizagens que me transmitiste.

À Doutora Carla Campos, deixo o meu mais sincero e aliviado agradecimento por me ter guiado e ajudado a resolver todo o autêntico drama da identificação de espécies. A sua disponibilidade imediata e o seu vasto conhecimento foram uma verdadeira salvação nos momentos de maior dúvida!

À minha binómia, Maria Luís, um obrigada gigante por me aturares impavidamente ao longo destes 5 anos. Foram incontáveis as horas passadas lado a lado na bancada do laboratório, a partilhar ansiedades, conquistas e muito trabalho. Foste uma companheira de batalhas incrível, um apoio essencial nos dias mais difíceis e a prova de que o trabalho de equipa torna tudo mais fácil. És, sem dúvida alguma, uma amiga para a vida!

À minha mãe, ao meu irmão Simão e ao Miguel. Não tenho palavras suficientes para descrever o quanto vos sou grata por me apoiarem sempre, nos dias de maior entusiasmo e nos de maior exaustão. O vosso amor, a vossa paciência e o vosso suporte incondicional foram o meu maior pilar ao longo de todo este percurso. Mamã, obrigada por me guiares para este caminho tão bonito, sem a tua luz e orientação, eu não teria escolhido esta profissão que hoje tanto me enche o coração. A ti, Simão, obrigada por me escolheres todos os dias como tua melhor amiga, a nossa cumplicidade é a minha força. E ao Miguel, obrigada por estares sempre lá, por seres o meu porto seguro e por tornares esta viagem muito mais leve, obrigada por te juntares a ela.

Aos meus avós, Mami e Papi, um agradecimento muito especial. Obrigada pelo orgulho imenso e desmedido que sempre demonstraram ter em mim. Ver o brilho nos vossos olhos a cada passo que dou é, e sempre será, a minha maior recompensa.

Ao meu grupo de amigos "Las Vegas", obrigada por todas as gargalhadas e, acima de tudo, por gozarem comigo e trazerem a dose de ironia e leveza necessárias para eu conseguir descomprimir do stress académico. Espero, genuinamente, que um dia voltemos a Genebra, principalmente para comprar chocolates e recriar as fotos no chafariz.

Por fim, a todas as pessoas especiais que se cruzaram no meu caminho ao longo deste percurso e que, de uma forma ou de outra, com uma palavra de incentivo, um abraço ou um conselho, contribuíram para esta conquista, o meu mais sincero muito obrigada.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIACÕES	XIII
ABSTRACT	XVI
RESUMO.....	XVIII
INTRODUÇÃO.....	- 2 -
MATERIAIS E MÉTODOS	- 7 -
I. POPULAÇÃO E RECOLHA DE AMOSTRAS	- 7 -
II. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	- 7 -
III. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS	- 7 -
IV. TIPAGEM DE ESTIRPE POR ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHA	- 8 -
V. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	- 9 -
RESULTADOS.....	- 11 -
I. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO	- 11 -
II. PREVALÊNCIA DAS ESPÉCIES DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> NA CAVIDADE ORAL E NASAL	- 11 -
IV. PERFIS DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E MULTIRRESISTÊNCIA.....	- 14 -
V. DINÂMICA DE COLONIZAÇÃO E PERSISTÊNCIA DA ESTIRPE AO LONGO DO TEMPO	- 18 -
DISCUSSÃO	- 22 -
REFERÊNCIAS	- 28 -
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	- 32 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das espécies de *Staphylococcus* detetadas exclusivamente na cavidade oral (esquerda) e detetadas nas cavidades oral e nasal (zona central). - 13 -

Figura 2: Gráfico de dispersão resultante da redução de dimensionalidade via PCA para amostras de *S. warneri*. Os polígonos coloridos delimitam os agrupamentos de participantes/grupos identificados pelos rótulos numéricos. Cada cor corresponde a um participante e cada forma representa um ponto no tempo. - 19 -

Figura 3: Gráfico de dispersão resultante da redução de dimensionalidade via PCA para amostras de *S. aureus*. Os polígonos coloridos delimitam os agrupamentos de participantes/grupos identificados pelos rótulos numéricos. Cada cor corresponde a um participante e cada forma representa um ponto no tempo. - 20 -

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização clínica e demográfica da população estudada. ...	- 11 -
Tabela 2: Prevalência de espécies de <i>Staphylococcus</i> entre os participantes em amostras da cavidade oral e nasal.	- 12 -
Tabela 3: Número de participantes colonizados por espécies de <i>Staphylococcus</i> na cavidade oral de acordo com o índice CPOD (Índice de dentes cariados, perdidos e obturados.)	- 14 -
Tabela 4: Número de participantes com isolados de <i>Staphylococcus</i> das cavidades nasal e oral que apresentaram resistência antimicrobiana a pelo menos um agente antimicrobiano (R) ou a três ou mais classes de antimicrobianos (MDR).	- 16 -
Tabela 5: Percentagem de resistência antimicrobiana entre as espécies de <i>Staphylococcus</i> isoladas das cavidades oral e nasal.	- 17 -

LISTA DE ABREVIACES

AMO – Amoxicilina

BHI – *Brain Heart Infusion*

CHL – Cloranfenicol

CIP – Ciprofloxacina

CLI – Clindamicina

CLSI – *Clinical & Laboratory Standards Institute*

CoNS – *Staphylococcus* coagulase negativo

CPOD – Dentes Cariados, Perdidos e Obturados

CXI – Cefoxitina

DNA – cido desoxirribonucleico

DP – Desvio padrão

eDNA – cido desoxirribonucleico extracelular

ERY – Eritromicina

EUCAST– *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FMDUP – Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

FTIR-ATR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy - Attenuated Total Reflectance*

GEN – Gentamicina

IR – Infravermelho

MALDI-TOF – *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization -Time of Flight*

MDR – Multirresistência

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente  Meticilina

MS – Espectrometria de massa

MSA – *Mannitol Salt Agar*

PCA – Análise de componentes principais

PCs – Componentes principais

QUD – Quinupristina-Dalfopristina

R – Resistente a pelo menos um antibiótico

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

S. capitis – *Staphylococcus capitis*

S. carnosus –*Staphylococcus carnosus*

S. cohnii – *Staphylococcus cohnii*

S. epidermidis – *Staphylococcus epidermidis*

S. haemolyticus – *Staphylococcus haemolyticus*

S. hominis – *Staphylococcus hominis*

S. lugdunensis – *Staphylococcus lugdunensis*

S. pasteurii – *Staphylococcus pasteurii*

S. pettenkoferi – *Staphylococcus pettenkoferi*

S. saprophyticus – *Staphylococcus saprophyticus*

S. warneri – *Staphylococcus warneri*

TET – Tetraciclina

TRS – Trimetoprim-sulfametoxazol

ABSTRACT

Introduction: The genus *Staphylococcus* includes approximately 70 species, many of which are recognized as common colonizers of human skin and mucous membranes, mainly of the nasal cavity. The oral cavity, although less frequently recognized as such, can also act as a reservoir for *Staphylococcus* species. Although several *Staphylococcus* species are pathogenic, *Staphylococcus aureus* remains the most clinically significant due to its pathogenic potential and the emergence of antibiotic-resistant strains, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Additionally, *coagulase-negative staphylococci*, despite generally presenting lower virulence, have been increasingly implicated in health care-associated infections, particularly in immunocompromised individuals.

Aims: This study aimed to characterize the prevalence, species diversity, longitudinal persistence, and antimicrobial resistance profiles of oral *staphylococci* in healthy young adults.

Methodology: *Staphylococcus* species were isolated from oral and nasal samples of 101 dentistry students and identified using matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Antimicrobial susceptibility was assessed according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines (or Clinical and Laboratory Standards Institute when applicable). Strain persistence was evaluated longitudinally in a subsample using Fourier Transform Infrared Spectroscopy.

Results: A high colonization rate was observed, with 91.1% of participants harboring oral *staphylococci*. *Staphylococcus epidermidis* (46.5%) and *Staphylococcus aureus* (9.9%) were the most prevalent. *Coagulase-negative staphylococci* showed high resistance levels, notably *Staphylococcus epidermidis*, with 95.4% of oral carriers harboring strains resistant to at least one antibiotic and 10.8% exhibiting multidrug resistance. While methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* was not detected, 100% of participants with oral *Staphylococcus aureus* carried resistant strains, showed resistance to commonly prescribed dental antibiotics, such as amoxicillin and erythromycin. Fourier Transform Infrared Spectroscopy analysis suggested distinct ecological dynamics: *Coagulase-negative staphylococci*, exemplified by *Staphylococcus warneri*, showing transient colonization and *Staphylococcus aureus* displaying evidence of persistence in a subset of individuals.

Conclusions: The oral cavity appears to be a relevant reservoir for diverse *Staphylococcus* species in healthy young adults, with high colonization rates and notable antimicrobial resistance, particularly among *Coagulase-negative staphylococci*. Longitudinal analysis suggested heterogeneous colonization dynamics, with indications of strain persistence for *Staphylococcus aureus* in some individuals. These findings highlight the potential role of the oral microbiota in the dissemination of antimicrobial resistance within the community.

Keywords: *Staphylococcus*, Oral cavity, Antibiotic resistance, Transient microbiota, Resident microbiota, Oral ecosystem, Oral microbiome.

RESUMO

Introdução: O género *Staphylococcus* inclui cerca de 70 espécies, muitas das quais são reconhecidas como colonizadoras comuns da pele e das membranas mucosas humanas, principalmente da cavidade nasal. A cavidade oral, ainda que menos frequentemente reconhecida como tal, pode igualmente atuar como reservatório de espécies de *Staphylococcus*. Embora várias espécies de *Staphylococcus* sejam patogénicas, o *Staphylococcus aureus* continua a ser o mais clinicamente significativo, devido ao seu potencial patogénico e ao surgimento de estirpes resistentes aos antibióticos, incluindo o *Staphylococcus aureus* resistente à metilina. Adicionalmente, os *Staphylococcus* coagulase-negativos, apesar de geralmente apresentarem menor virulência, têm vindo a ser implicados num crescente número de infeções associadas aos cuidados de saúde, particularmente em indivíduos imunocomprometidos.

Objetivos: Este estudo teve como objetivo caracterizar a prevalência, a diversidade de espécies, a persistência longitudinal e os perfis de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* orais em adultos jovens saudáveis.

Metodologia: As espécies de *Staphylococcus* foram isoladas de amostras orais e nasais de 101 estudantes de medicina dentária e identificadas por *matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*. A suscetibilidade antimicrobiana foi avaliada de acordo com as orientações do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines* (ou do *Clinical and Laboratory Standards Institute*, quando aplicável). A persistência de estirpes foi avaliada longitudinalmente numa sub-amostra utilizando *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*.

Resultados: Observou-se uma elevada taxa de colonização, com 91,1% dos participantes a apresentarem *Staphylococcus* orais. As espécies *Staphylococcus epidermidis* (46,5%) e *Staphylococcus aureus* (9,9%) foram as mais prevalentes. As espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos apresentaram níveis de resistência antimicrobiana elevados, nomeadamente a espécie *Staphylococcus epidermidis*, com 95,4% dos portadores orais a apresentarem estirpes resistentes a pelo menos um antibiótico e 10,8% a exibirem multirresistência. Embora não tenha sido detetado *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, 100% dos participantes colonizados com *Staphylococcus aureus* na cavidade oral apresentavam estirpes resistentes, demonstrando resistência aos antibióticos dentários habitualmente prescritos, como a amoxicilina e a eritromicina. A análise por *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* sugeriu dinâmicas ecológicas distintas: *Staphylococcus* coagulase-negativos, ilustrados por *Staphylococcus warneri*, mostrando colonização transitória e *Staphylococcus aureus* exibindo evidências de persistência num subconjunto de indivíduos.

Conclusões: A cavidade oral parece ser um reservatório relevante para diversas espécies de *Staphylococcus* em adultos jovens saudáveis, com elevadas taxas de colonização e notável resistência antimicrobiana, particularmente entre *Staphylococcus* coagulase-negativos. A análise longitudinal sugeriu dinâmicas

de colonização heterogêneas, com indícios de persistência da estirpe *Staphylococcus aureus* em alguns indivíduos. Estes achados destacam o potencial papel da microbiota oral na disseminação da resistência antimicrobiana na comunidade.

Palavras-chave: *Staphylococcus*, Cavidade oral, Resistência aos antibióticos, Microbiota transitória, Microbiota residente, Ecossistema oral, Microbioma oral.

1. INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A cavidade oral humana é um dos ecossistemas mais complexos e biologicamente diversos do corpo humano (1, 2). Funciona como a porta de entrada para os sistemas digestivo e respiratório, abrigando uma comunidade microbiana rica e dinâmica, coletivamente denominada microbioma oral (1-3). Este ecossistema não é composto apenas por bactérias, englobando também fungos, vírus e microeucariotas, que interagem continuamente de forma sinérgica e competitiva (2, 4).

Em termos anatómicos e fisiológicos, a cavidade oral não constitui um ambiente homogêneo, pelo contrário, engloba múltiplos nichos ecológicos distintos (2). As superfícies descamativas (como a mucosa jugal, o palato e o dorso da língua) e as superfícies não descamativas (como os dentes e materiais protéticos) oferecem diferentes substratos para a adesão microbiana (5-7). Consequentemente, a composição da microbiota varia significativamente entre a saliva, a placa supragengival, o biofilme subgengival e os diferentes tecidos moles (8, 9).

A estabilidade deste ecossistema, frequentemente designada por eubiose, é modulada por uma multiplicidade de fatores. Entre os determinantes intrínsecos destacam-se o fluxo e a composição da saliva (que atua na limpeza mecânica e contém componentes antimicrobianos, como lisozimas e imunoglobulinas), o pH local, o potencial de oxirredução e a resposta imunitária do hospedeiro (9). Em paralelo, fatores extrínsecos, tais como os hábitos dietéticos, as práticas de higiene oral, o estilo de vida e o uso de agentes antimicrobianos, exercem uma pressão seletiva constante sobre a comunidade microbiana oral (9, 10). Quando este equilíbrio é perturbado, ocorre um estado de disbiose, propiciando a transição de microrganismos essencialmente comensais para um perfil oportunista e potencialmente patogénico (11).

O género *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae* e é tipicamente caracterizado por bactérias esféricas (cocos) Gram-positivas, imóveis e não formadoras de esporos. Estas bactérias organizam-se frequentemente em aglomerados irregulares nos esfregaços, assemelhando-se a cachos de uvas.

Sendo organismos anaeróbios facultativos e catalase-positivos, possuem uma notável flexibilidade metabólica para sobreviver em ambientes com diferentes disponibilidades de oxigênio, uma característica essencial para a sua adaptação a diversos nichos do corpo humano (12).

Do ponto de vista clínico e microbiológico, este gênero inclui cerca de 70 espécies e é tradicionalmente dividido em dois grandes grupos, com base na capacidade de sintetizar a enzima coagulase (12-14). Dentro do grupo de *Staphylococcus* coagulase-positivos, a espécie *S. aureus* é o único representante com relevância clínica. A espécie *S. aureus* é reconhecida como um patógeno humano altamente virulento e de elevada relevância clínica, sendo capaz de causar desde infecções superficiais cutâneas até condições sistêmicas graves, como endocardites, pneumonias e septicemias (15-17).

Em contrapartida, as espécies *Staphylococcus* coagulase-negativos representam um grupo vasto e diversificado de espécies (incluindo *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, entre muitas outras). Historicamente, os CoNS foram considerados comensais inócuos e constituintes padrão da microbiota normal humana (18-20).

No ser humano, as superfícies cutâneas e as narinas anteriores são consideradas o nicho ecológico primário e o reservatório anatômico principal das espécies de *Staphylococcus* (20). A presença de *Staphylococcus* na cavidade oral tem sido objeto de debate contínuo na literatura científica. Devido à proximidade anatômica e à comunicação fisiológica direta entre a nasofaringe e a orofaringe, é plausível que muitas das bactérias detetadas na cavidade oral tenham origem nas narinas anteriores. Através de processos como a deglutição, a aspiração ou o transporte por secreções respiratórias, estes microrganismos podem alcançar a cavidade oral. Contudo, os mecanismos exatos e a relevância desta migração permanecem ainda incertos (14, 17, 21-24).

No entanto, evidências crescentes têm demonstrado que várias espécies deste gênero, em particular os CoNS, são isoladas com elevada frequência na cavidade oral de indivíduos sistêmica e oralmente saudáveis (21, 23). Esta permanência sugere a capacidade de integração no biofilme oral, indicando a existência de mecanismos de persistência específicos da cavidade oral. Deste

modo, coloca-se a hipótese se estas populações poderão conseguir ultrapassar a condição de meros transientes, assumindo-se como residentes do ecossistema e participando ativamente nas dinâmicas ecológicas locais (25, 26).

Embora as espécies de *Staphylococcus* atuem majoritariamente como colonizadores comensais num ambiente oral saudável, o seu potencial patogénico pode emergir sob condições específicas (21, 23, 25). Cenários de disbiose induzidos por imunossupressão, desequilíbrios nutricionais, redução do fluxo salivar ou higiene oral deficiente podem precipitar a transição destas bactérias de um estado de simbiose pacífica para o de patógenos oportunistas (18, 19, 21, 25, 27, 28).

Neste contexto de oportunismo, a característica de virulência mais crítica dos *Staphylococcus* é a sua notável capacidade de formar biofilmes estruturados (29). O desenvolvimento do biofilme envolve a produção de uma matriz polimérica extracelular, constituída por polissacáridos, proteínas e *DNA*, que encapsula a comunidade bacteriana (10). Esta estrutura tridimensional confere vantagens ecológicas e de sobrevivência extremas: protege as células da remoção mecânica (como a mastigação e a escovagem), impede a penetração eficaz de agentes antimicrobianos e permite a evasão aos mecanismos de defesa imunitária do hospedeiro, nomeadamente através da resistência à fagocitose (29, 30).

A patogenicidade das espécies de *Staphylococcus* formadores de biofilme assume uma gravidade acrescida face à crise global de resistência antimicrobiana. A utilização terapêutica excessiva de antibióticos tem exercido uma intensa pressão seletiva no ecossistema oral, resultando na emergência de estirpes bacterianas multirresistentes (31, 32). A espécie *S. aureus*, impulsionado pela aquisição de genes cruciais como o *mecA*, que confere resistência à meticilina (MRSA), continua a ser um patógeno de elevada preocupação clínica, com isolados frequentemente reportados em amostras orais (22, 33).

Simultaneamente, os CoNS têm revelado perfis de resistência cada vez mais alarmantes, atuando frequentemente como reservatórios silenciosos de resistência a várias classes de antibióticos (34). Do ponto de vista genético, a

cavidade oral parece constituir um ambiente ótimo para a disseminação desta resistência. A elevada densidade celular e a proximidade física entre microrganismos dentro da matriz do biofilme, facilitam consideravelmente a transferência horizontal de genes, através de processos de conjugação, transformação e transdução (35). Estes fenómenos permitem a partilha de perfis de resistência não apenas entre diferentes espécies de *Staphylococcus*, mas também com outras bactérias residentes no microbioma oral.

Dada a evidente diversidade funcional ao nível da estirpe e o potencial patogénico dependente do contexto dentro deste género, as espécies de *Staphylococcus* orais não devem ser vistas apenas como invasores oportunistas esporádicos. Esclarecer se estas populações são predominantemente residentes ou transitórias e, nomeadamente, se derivam exclusivamente de reservatórios nasais ou se possuem mecanismos de persistência ecológica específicos da cavidade oral é essencial para compreender o seu verdadeiro papel no microbioma oral e as suas implicações para a saúde do hospedeiro.

Assim, este estudo teve como objetivo caracterizar a colonização oral por *Staphylococcus* em adultos jovens saudáveis, incluindo a diversidade de espécies, os perfis de suscetibilidade antimicrobiana e a dinâmica longitudinal da colonização, a fim de explorar se essas populações exibem padrões transitórios ou persistentes na cavidade oral.

2. METODOLOGIA

MATERIAIS E MÉTODOS

I. População e Recolha de Amostras

A amostra incluiu um total de 101 estudantes do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto (FMDUP). Após a obtenção do consentimento informado, cada participante preencheu um questionário sobre dados demográficos e antecedentes clínicos, como hábitos tabágicos, episódios infecciosos e toma de antibióticos ou probióticos nos últimos 6 meses. Consequentemente, os critérios de exclusão incluíram o uso de antibióticos ou a ocorrência de infeções num período inferior a 6 meses, com o objetivo de garantir a estabilidade do ecossistema oral estudado. Relativamente à saúde oral, foram registados casos de gengivite, utilização de próteses fixas e valores do índice CPOD (dentes cariados, perdidos e obturados).

A recolha das amostras orais e nasais foi efetuada com zaragatoas estéreis, num único momento em todos os participantes (n=101). Adicionalmente, foram recolhidas amostras orais em quatro momentos (T0, T1, T2, T3) num subgrupo de 31 indivíduos para explorar a dinâmica de colonização utilizando a tipagem de estirpes por *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR-ATR).

II. Isolamento de microrganismos e Identificação dos Isolados

As amostras foram semeadas em ágar sal manitol (VWR Chemicals, Leuven, Bélgica) e incubadas a 37 °C durante 48 horas. As colónias morfologicamente distintas foram subcultivadas (3 a 6 por amostra) para purificação. Os isolados foram identificados por espectrometria de massa MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Apenas as identificações com pontuação $\geq 2,0$, representando identificação ao nível da espécie, foram consideradas.

III. Avaliação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos

O perfil de suscetibilidade aos antibióticos dos isolados foi avaliado através do método de difusão em disco em ágar *Mueller Hinton II* (Alliance Bio Expertise, França), seguindo as diretrizes do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2026) ou, quando não aplicável, do *Clinical and*

Laboratory Standards Institute (CLSI, 2026) (Tabela 1S). Foram testados nove antibióticos: Amoxicilina (AMO, 10 µg); Cefoxitina (CXI, 30 µg); Cloranfenicol (CHL, 30 µg); Ciprofloxacina (CIP, 5 µg); Clindamicina (CLI, 2 µg); Eritromicina (ERY, 15 µg); Gentamicina (GEN, 10 µg); Tetraciclina (TET, 30 µg); Trimetoprim + Sulfametoxazol (TRS, 25 µg) (Liofilchem, Itália). Adicionalmente, a Quinupristina-Dalfopristina (QUD, 15 µg) foi avaliada exclusivamente para isolados de *S. aureus*. De notar que as diretrizes mais recentes não definem pontos de corte para a avaliação da amoxicilina, contudo, dada a sua ampla prescrição em medicina dentária (36), optou-se por manter a sua avaliação no presente estudo, recorrendo aos valores de referência estabelecidos pelo CLSI de 2020 (Tabela 1). O *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 foi utilizado como estirpe de controlo de qualidade. Os isolados que apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico foram classificados como resistentes (R). Os isolados que apresentaram resistência a três ou mais classes de antibióticos foram classificados como multirresistentes (MDR).

IV. Tipagem de estirpe por espectroscopia infravermelha

Para avaliar a relação entre estirpes, avaliar a potencial persistência da colonização e explorar os padrões de colonização ao longo do tempo, foi realizada a tipagem fenotípica das estirpes utilizando o sistema IR Biotyper® (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Esta análise centrou-se num subgrupo de participantes monitorizados longitudinalmente (n=31), com amostras recolhidas em quatro momentos distintos: no início do estudo (T0), após 5 meses (T1) e em dois seguimentos adicionais 2 e 3 semanas depois (T2 e T3, respetivamente). A tipagem foi aplicada especificamente a isolados de *S. aureus* e *S. warneri* de indivíduos nos quais a mesma espécie foi detetada em dois ou mais momentos. Esta abordagem metodológica permitiu a identificação de padrões de similaridade entre estirpes ao longo do tempo, sendo possível inferir a sua potencial persistência (presença de perfis de estirpes altamente semelhantes ao longo do tempo) ou renovação (presença de perfis de estirpes distintos).

O procedimento laboratorial foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, seguindo uma sementeira padronizada utilizando até seis réplicas do

mesmo isolado. A aquisição dos espectros e o controle de qualidade foram realizados automaticamente pelo *software*, e a semelhança entre os isolados foi calculada utilizando a distância euclidiana com base na região espectral dos polissacarídeos, comumente utilizada para a discriminação bacteriana em análises baseadas em FTIR. O agrupamento hierárquico foi realizado pelo *software* IR Biotyper® utilizando a ligação média. Os valores de corte para o agrupamento foram determinados a partir do conjunto de dados, com base nos padrões de similaridade intra-amostra.

V. Análise estatística

O *software* SPSS (IBM® SPSS® Statistics, SPSS Inc, Chicago, IL, EUA, versão 29) foi utilizado para a análise estatística. As variáveis categóricas foram descritas através de frequências absolutas ou relativas (%). As diferenças entre os grupos para as variáveis categóricas foram analisadas através do teste exato de Fisher, enquanto o teste exato de McNemar foi utilizado para comparações pareadas. As variáveis contínuas foram descritas como média $\pm$ desvio padrão (DP), e o teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade da distribuição. Para as variáveis contínuas sem distribuição normal, foi aplicado o teste de Mann-Whitney para a comparação das médias entre dois grupos. A significância estatística foi considerada quando os valores de p foram inferiores a 0,05.

3. RESULTADOS

RESULTADOS

I. Caracterização da população

As informações clínicas e demográficas dos participantes estão incluídas na Tabela 1. De um modo geral, a coorte estudada era constituída predominantemente por mulheres jovens adultas, com uma baixa prevalência de tabagismo. Em termos de saúde oral, as participantes apresentavam geralmente um bom estado de saúde oral, caracterizado por um baixo índice de dentes cariados, perdidos e obturados e raras ocorrências de gengivite ou próteses fixas.

Tabela 1: Caracterização clínica e demográfica da população estudada.

Fatores Clínicos e Demográficos	
Sexo (feminino; masculino), %	81.5%; 18.68%
Idade, anos	21.54 ± 2.63
Hábitos tabágicos, %	4.35%
Próteses, %	3.26%
Gengivite, %	4.35%
CPOD	2.60 ± 2.62

Os resultados são apresentados em prevalência (%) ou como média ± DP. CPOD, índice de dentes cariados, perdidos e obturados.

II. Prevalência das espécies de *Staphylococcus* na cavidade oral e nasal

Foram identificados um total de 364 isolados de *Staphylococcus*, distribuídos entre as cavidades nasal (n=203) e oral (n=161) (Tabela 2S). Observou-se uma taxa de colonização muito elevada em ambos os nichos anatómicos, afetando 95,1% das cavidades nasais e 91,1% das cavidades orais (Tabela 2). A sobreposição ecológica foi substancial, com 86,1% dos indivíduos a apresentarem colonização simultânea (oronasal) (Tabela 2). Entre os indivíduos co-colonizados, *S. epidermidis* (46,5%) e *S. aureus* (9,9%) destacaram-se como as espécies colonizadoras mais prevalentes na população (Tabela 2). Quando

os nichos foram analisados separadamente, observaram-se prevalências distintas entre a cavidade oral e a cavidade nasal. Na cavidade oral, *S. epidermidis* e *S. aureus* foram detetados em 64,4% e 21,8% dos participantes, respetivamente, enquanto na cavidade nasal estes valores foram de 67,3% e 33,8% (Tabela 2).

Tabela 2: Prevalência de colonização oral e nasal por *Staphylococcus* entre os participantes.

<i>Staphylococcus</i> spp.	Oral e Nasal		Oral		Nasal		<i>p</i>
	n	%	n	%	n	%	
<i>Staphylococcus</i>	87	86.1%	92	91.1%	96	95.1%	0.424
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	9.9%	22	21.8%	24	23.8%	0.845
<i>Staphylococcus capitis</i>	2	2.0%	7	6.9%	20	19.8%	0.011*
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1	1.0%	1	1.0%	1	1.0%	1.000
<i>Staphylococcus carnosus</i> group	0	0.0%	1	1.0%	0	0.0%	1.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	47	46.5%	65	64.4%	68	67.3%	0.749
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0	0.0%	3	3.0%	3	3.0%	1.000
<i>Staphylococcus hominis</i>	0	0.0%	2	2.0%	4	4.0%	0.687
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	0.0%	2	2.0%	3	3.0%	1.000
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	2	2.0%	10	9.9%	4	4.0%	0.109
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	0	0.0%	2	2.0%	0	0.0%	0.500
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3	3.0%	6	5.9%	15	14.9%	0.035*
<i>Staphylococcus warneri</i>	5	5.0%	18	17.8%	24	23.8%	0.377

*A significância estatística das diferenças nas frequências de colonização entre amostras emparelhadas das cavidades oral e nasal foi determinada através do teste exato de McNemar. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo e está destacado a negrito.

A distribuição das diferentes espécies de *Staphylococcus* identificadas nas cavidades oral e nasal está esquematicamente representada na Figura 1, destacando a sobreposição de espécies e a presença de colonizadores específicos de nicho. Apesar da presença ubíqua do género, foram registadas preferências anatómicas estatisticamente significativas para determinadas espécies. As análises foram realizadas tanto ao nível do participante (Tabela 2) como ao nível dos isolados, considerando cada isolado independentemente do participante de origem (Tabela 2S). Contudo, as comparações estatísticas foram realizadas apenas ao nível do participante (Tabela 2), uma vez que foram

isoladas 5 a 6 colônias por participante, comprometendo a independência das observações ao nível dos isolados. *S. capitis* e *S. saprophyticus* apresentaram maior prevalência na cavidade nasal. O nicho oral destacou-se por hospedar exclusivamente isolados do grupo *S. carnosus* e *S. pettenkoferi* (Tabelas 2 e 2S).

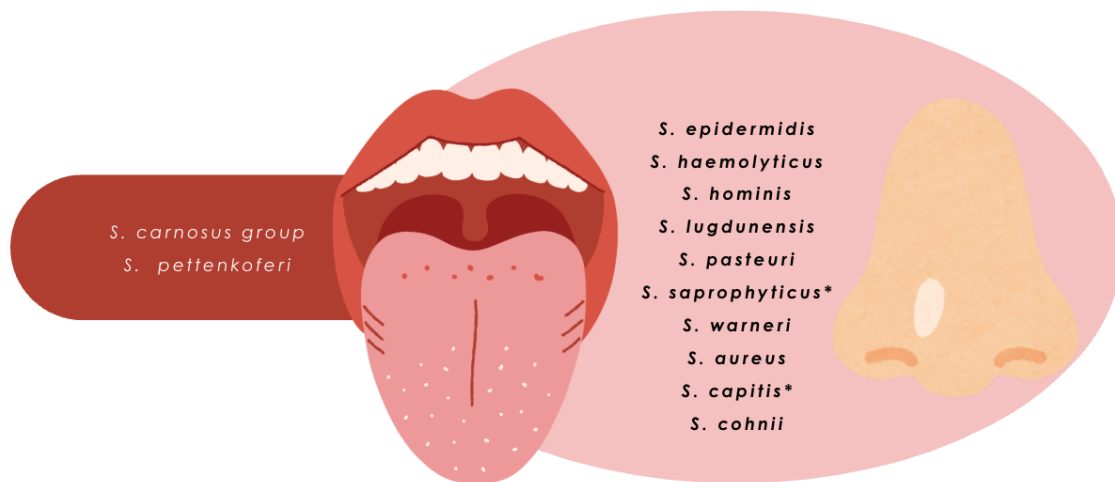


Figura 1: Representação esquemática das espécies de *Staphylococcus* detetadas exclusivamente na cavidade oral (esquerda) e detetadas nas cavidades oral e nasal (zona central).

III. Associação entre a colonização por *Staphylococcus* e a Saúde Oral

A colonização por *Staphylococcus* na cavidade oral não apresentou associação estatisticamente significativa com o estado de saúde oral, avaliado pelo índice CPOD ($p > 0,05$) (Tabela 3). Além disso, os valores do CPOD foram comparados entre os participantes com e sem colonização oral por *S. aureus*, não tendo sido encontrada qualquer diferença estatisticamente significativa ($2,67 \pm 2,38$ vs. $2,58 \pm 2,69$; Mann-Whitney U = 626,5; $p = 0,693$).

Devido à baixa prevalência de gengivite e ao baixo número de participantes que utilizavam próteses dentárias, não foi realizada qualquer análise estatística para estas variáveis.

Tabela 3: Número de participantes colonizados por espécies de *Staphylococcus* na cavidade oral de acordo com o índice CPOD.

<i>Staphylococcus</i> spp.	CPOD = 0		CPOD > 0		p
	n	%	n	%	
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	16.0%	14	12.0%	0.770
<i>Staphylococcus capitis</i>	1	4.0%	5	7.5%	1.000
<i>Staphylococcus cohnii</i>	0	0.0%	0	0.0%	-
<i>Staphylococcus carnosus</i> group	1	4.0%	0	0.0%	0.272
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13	52.0%	44	65.7%	0.239
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0	0.0%	2	3.0%	1.000
<i>Staphylococcus hominis</i>	0	0.0%	2	3.0%	1.000
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1	4.0%	1	1.5%	0.472
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	1	4.0%	7	10.4%	0.440
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	0	0.0%	2	3.0%	1.000
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3	12.0%	3	4.5%	0.339
<i>Staphylococcus warneri</i>	4	16.0%	12	17.9%	1.000

Os valores de p foram calculados através do teste exato de Fisher.

IV. Perfis de resistência antimicrobiana e multirresistência

A avaliação da suscetibilidade revelou taxas de resistência global mais elevadas à gentamicina, eritromicina e amoxicilina. Entre os participantes colonizados com CoNS, os perfis de resistência foram clinicamente relevantes. Especificamente, os participantes portadores de *S. epidermidis* apresentaram os níveis mais elevados de resistência e MDR em ambos os nichos anatómicos: 95,4% (oral) e 97,1% (nasal) destes participantes demonstraram resistência a pelo menos um antibiótico, enquanto 10,8% e 5,9% exibiram um fenótipo multirresistente (MDR), respetivamente (Tabela 4). Além disso, ao comparar as frequências de resistência (R) e multirresistência (MDR) entre as cavidades oral e nasal com base no número total de participantes colonizados por local, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre todas as espécies (Tabela 4).

Relativamente ao *S. aureus*, 100% dos participantes com colonização oral e 91,7% com colonização nasal apresentavam estirpes resistentes a pelo menos

um agente farmacológico (Tabelas 4 e 5). Embora a multirresistência estivesse ausente nos portadores nasais de *S. aureus*, 9,1% dos participantes portadores de *S. aureus* oral apresentaram um fenótipo MDR (Tabelas 4 e 5). Apesar disso, não foi registado qualquer caso de resistência à cefoxitina, indicando a ausência de estirpes de MRSA entre os participantes da população estudada.

A análise comparativa revelou ainda que a proporção de participantes portadores de *S. aureus* resistente à gentamicina e à clindamicina foi significativamente superior à de participantes portadores de CoNS em ambas as cavidades (Tabelas 4 e 5). Por outro lado, a colonização por estirpes resistentes ao trimetoprim-sulfametoxazol na cavidade oral foi significativamente mais prevalente entre os participantes do grupo CoNS ($p = 0,045$).

Ao comparar os perfis de resistência antimicrobiana entre os dois nichos anatómicos, a cavidade oral demonstrou ser tão relevante como a cavidade nasal. Por exemplo, entre os participantes colonizados por *S. epidermidis* (o CoNS mais prevalente), a cavidade oral apresentou uma taxa de resistência (R) a pelo menos um agente de 95,4% e uma taxa de multirresistência (MDR) de 10,8% (Tabela 4). Estes valores foram comparáveis às taxas observadas na cavidade nasal (97,1% e 5,9%, respetivamente), não havendo diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,676$ para R; $p = 0,358$ para MDR) (Tabela 4). Da mesma forma, para *S. aureus*, 100% dos portadores orais albergavam estirpes resistentes e 9,1% exibiam MDR, em comparação com 91,7% e 0% na cavidade nasal, respetivamente ($p = 0,490$ para R; $p = 0,223$ para MDR). De facto, em todas as espécies identificadas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas frequências de R e MDR entre as cavidades oral e nasal (Tabela 4).

Tabela 4: Número de participantes com isolados de *Staphylococcus* das cavidades nasal e oral que apresentaram resistência antimicrobiana a pelo menos um agente antimicrobiano (R) ou a três ou mais classes de antimicrobianos (MDR).

<i>Staphylococcus</i> Spp.	Oral			Nasal			<i>p</i> (R)	<i>p</i> (MDR)
	n	R (%)	MDR (%)	n	R (%)	MDR (%)		
<i>Staphylococcus aureus</i>	22	100%	9.1%	24	91.7%	0.0%	0.490	0.223
<i>Staphylococcus capitis</i>	7	85.7%	0.0%	20	95.0%	0.0%	0.459	1.000
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1	100%	0.0%	1	100%	0.0%	1.000	1.000
<i>Staphylococcus carnosus group</i>	1	100%	0.0%	0	0.0%	0.0%	1.000	1.000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	65	95.4%	10.8%	68	97.1%	5.9%	0.676	0.358
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3	100%	33.3%	3	100%	33.3%	1.000	1.000
<i>Staphylococcus hominis</i>	3	66.7%	0.0%	4	75.0%	75.0%	1.000	0.143
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	3	66.7%	0.0%	3	100%	33.3%	1.000	1.000
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	10	90.0%	0.0%	4	100%	0.0%	1.000	1.000
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	2	100%	0.0%	0	0.0%	0.0%	1.000	1.000
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	6	83.3%	0.0%	15	100%	0.0%	0.286	1.000
<i>Staphylococcus warneri</i>	18	83.3%	5.6%	24	95.8%	0.0%	0.297	0.429

Número de participantes com isolados de *Staphylococcus* das cavidades nasal e oral que apresentaram resistência antimicrobiana a pelo menos um agente antimicrobiano (R) ou a três ou mais classes de antimicrobianos (resistência a múltiplos fármacos – MDR).

Tabela 5: Percentagem de resistência antimicrobiana entre as espécies de *Staphylococcus* isoladas das cavidades oral e nasal.

		% Resistência a Antibióticos																					
Staphylococcus spp.	n	AMO		CXI		CIP		CHL		GEN		TET		TRS		ERY		CLI		QUD			
		Oral	Nasal	Oral	Nasal	Oral	Nasal	Oral	Nasal	Oral	Nasal	Oral	Nasal	Oral	Nasal	Oral	Nasal	Oral	Nasal	Oral	Nasal		
S. aureus	24	27	46%	41%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	58%	74%	4%	0%	0%	0%	29%	33%	29%	33%	0%	0%
CoNS	137	176	28%	28%	3%	2%	1%	0%	0%	0%	1%	28%	26%	9%	11%	15%	12%	41%	44%	10%	13%		
S. capitis	7	22	0%	9%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	23%	0%	5%	0%	9%	43%	36%	0%	14%		
S. cohnii	1	1	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	100%	0%	100%	100%	100%	0%		
S. carnosus group	1	0	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%		
S. epidermidis	80	91	31%	32%	3%	2%	1%	0%	0%	0%	0%	14%	14%	13%	11%	23%	13%	44%	44%	13%	13%		
S. haemolyticus	3	3	67%	0%	33%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	33%	0%	0%	33%	67%	100%	67%	33%	0%		
S. hominis	2	4	0%	75%	0%	50%	0%	0%	0%	0%	0%	50%	25%	50%	50%	50%	75%	50%	75%	0%	0%		
S. lugdunensis	2	4	0%	50%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	25%	0%	25%	0%	0%	50%	25%	0%	25%		
S. pasteurii	11	4	36%	50%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	55%	75%	0%	0%	0%	25%	36%	25%	0%	0%		
S. pettenkoferi	2	0	0%	0%	50%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	50%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%		
S. saprophyticus	6	17	0%	12%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	83%	76%	0%	12%	0%	0%	0%	29%	0%	18%		
S. warneri	22	30	36%	33%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	3%	55%	27%	5%	10%	0%	3%	36%	53%	9%	10%		

Os resultados para a Quinupristina-Dalfopristina (QUD) são apresentados exclusivamente para *S. aureus*, dado que as atuais diretrizes para testes de suscetibilidade antimicrobiana (EUCAST/CLSI) recomendam testes e pontos de corte clínicos apenas para esta espécie específica.

V. Dinâmica de colonização e persistência da estirpe ao longo do tempo

A dinâmica temporal das estirpes de *S. warneri* e *S. aureus* foi avaliada através da análise dos espectros FTIR-ATR de isolados recuperados de cada participante até quatro pontos de amostragem (T0, T1, T2 e T3). Para ambas as espécies, o agrupamento hierárquico foi realizado utilizando a distância euclidiana e o algoritmo de ligação média, resultando em dendrogramas com elevados coeficientes de correlação cofenética de 0,919 para *S. warneri* e 0,862 para *S. aureus*, indicando concordância entre o dendrograma e a matriz de distâncias original (*S. warneri* - Figuras 1S; *S. aureus* - Figuras 2S).

Para *S. warneri*, o valor de corte para o agrupamento (0,160) foi selecionado com base em padrões de similaridade intra-amostra, dado que os isolados recuperados do mesmo participante no mesmo ponto temporal agruparam-se consistentemente abaixo deste limiar, corroborando a sua utilização para definir perfis de estirpes altamente semelhantes dentro do conjunto de dados (Figura 1S - isolados 50 e 79 do Participante 1 em T1). Utilizando este limiar, os isolados de *S. warneri* apresentaram uma acentuada heterogeneidade ao longo dos pontos temporais, sugerindo padrões de colonização dinâmicos (Figura 1S). Esta dispersão foi corroborada pela Análise de Componentes Principais (PCA), em que seis Componentes Principais (PCs) foram suficientes para explicar 95,2% da variância, refletindo a variabilidade espectral estruturada entre os isolados (Figura 2).

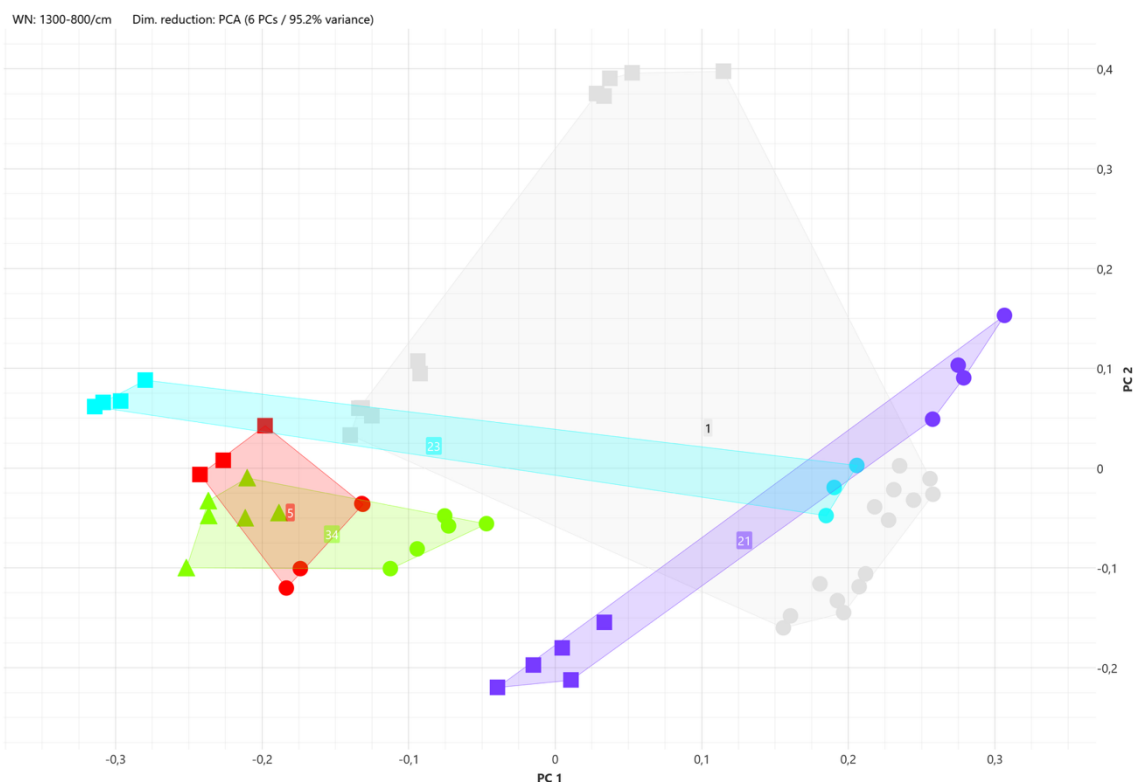


Figura 2: Gráfico de dispersão resultante da redução de dimensionalidade via PCA para amostras de *S. warneri*. Os polígonos coloridos delimitam os agrupamentos de participantes/grupos identificados pelos rótulos numéricos. Cada cor corresponde a um participante e cada forma representa um ponto no tempo.

Em contraste, o *S. aureus* apresentou padrões de colonização mais heterogêneos entre os indivíduos. Utilizando o mesmo ponto de corte (0,160) para a consistência, foram observados diferentes padrões temporais. Em alguns participantes (p. ex., P3, P22, P26), os isolados de dois ou mais momentos de recolha agruparam-se, sugerindo a persistência de perfis de estirpes semelhantes ao longo do tempo (Figuras 2S). Noutros (por exemplo, P29 e P4), os isolados foram distribuídos por diferentes grupos, indicando uma mudança de perfil entre os pontos de amostragem. Esta variabilidade de *S. aureus* refletiu-se também na análise multivariada, onde foram necessários 11 componentes principais (PCs) para explicar 95,2% da variância, sugerindo uma distribuição complexa de perfis espectrais dentro desta espécie (Figura 3).

WN: 1300-800/cm Dim. reduction: PCA (11 PCs / 95.2% variance)

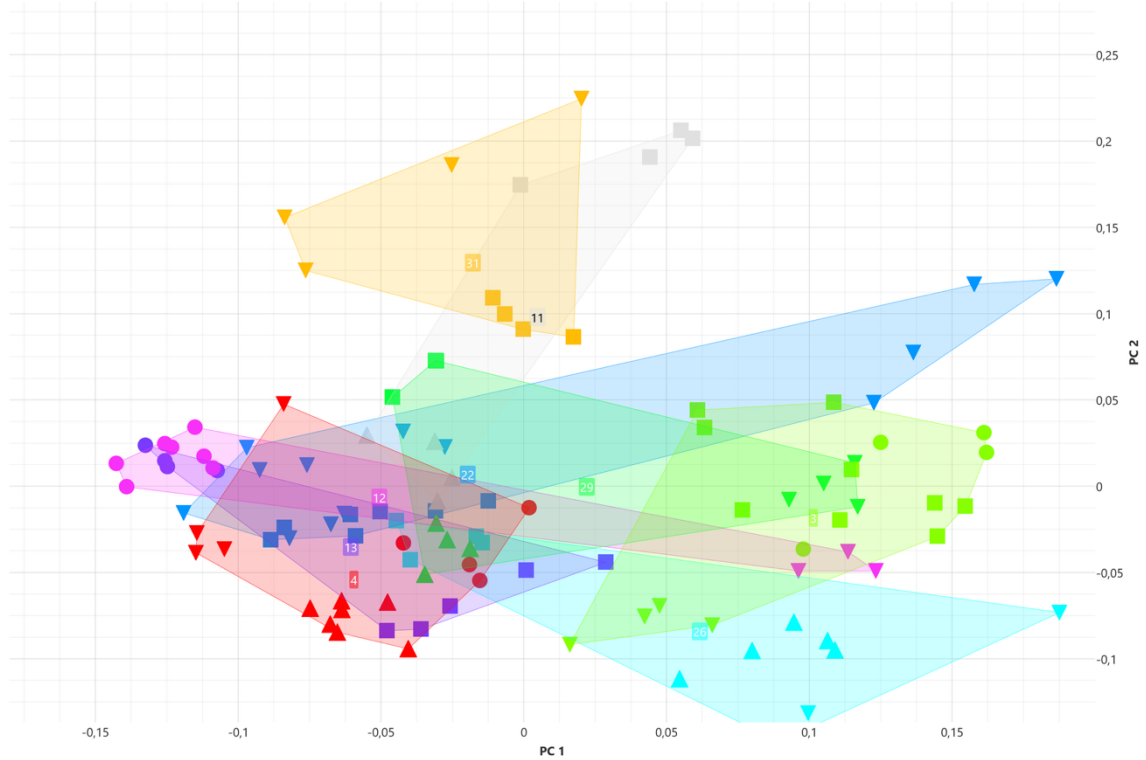


Figura 3: Gráfico de dispersão resultante da redução de dimensionalidade via PCA para amostras de *S. aureus*. Os polígonos coloridos delimitam os agrupamentos de participantes/grupos identificados pelos rótulos numéricos. Cada cor corresponde a um participante e cada forma representa um ponto no tempo.

4. DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo destacam a relevância da cavidade oral como um nicho ecológico frequentemente colonizado e potencialmente importante para as espécies de *Staphylococcus*. A elevada taxa de colonização oral (91,09%) combinada com a forte sobreposição oronasal (86,14%) sugere que a cavidade oral pode atuar como um reservatório primário e viável para estas bactérias (21-23, 37).

A sobreposição substancial de espécies de *Staphylococcus* entre as cavidades oral e nasal reforça a relevância do meio oral como nicho ecológico para este género. A presença de mais de 150 isolados de amostras orais, incluindo múltiplas espécies detetadas repetidamente em diferentes indivíduos, reforça o conceito de que a cavidade oral representa mais do que um local transitório de colonização. Curiosamente, os isolados pertencentes ao grupo *S. carnosus* e *S. pettenkoferi* foram detetados exclusivamente em amostras orais. No entanto, dado o número limitado de isolados destas espécies, estes achados devem ser interpretados com cautela. De um modo geral, estas observações corroboram as crescentes evidências de que a cavidade oral pode contribuir para a manutenção ecológica e disseminação de espécies de *Staphylococcus* em indivíduos saudáveis (21, 22).

O facto de a colonização destas espécies ser independente do índice CPOD sugere que estas poderão constituir componentes habituais da microbiota oral, estando presentes mesmo na ausência de patologia dentária ou disbiose. Além disso, o género *Staphylococcus* foi recentemente associado a indivíduos livres de cárie, apontando para um possível papel mediador entre a dieta e a cárie dentária. Embora esta relação permaneça complexa, a sua presença parece refletir um equilíbrio ecológico dinâmico, em vez de um papel estritamente patogénico (38).

Apesar de a maioria das espécies detetadas neste estudo serem comensais conhecidas, o perfil de suscetibilidade antimicrobiana detetado assume uma dimensão preocupante. A cavidade oral revelou ser um reservatório silencioso, mas altamente ativo, de genes de resistência, particularmente mediados pelo grupo *Staphylococcus* coagulase-negativo. O facto de 95% dos isolados de

CoNS serem resistentes a pelo menos um fármaco e de *S. epidermidis* atuar como catalisador da multirresistência (MDR) demonstra o elevado grau de disseminação e partilha de determinantes genéticos na comunidade, transformando a cavidade oral num ponto focal para a evolução da resistência bacteriana (34). No entanto, o isolamento de *S. aureus* 100% suscetível à cefoxitina corrobora o perfil jovem e saudável da amostra, isenta de infeções por MRSA normalmente encontradas em ambientes hospitalares (33).

Curiosamente, os perfis de suscetibilidade global mais críticos (gentamicina, eritromicina e amoxicilina) podem refletir o impacto direto das práticas de prescrição presentes na medicina dentária em Portugal (36). Embora as recentes orientações para testes de suscetibilidade não apresentem um ponto de corte específico para a amoxicilina nas espécies de *Staphylococcus*, este antibiótico foi deliberadamente incluído na nossa avaliação, aplicando os pontos de corte do CLSI 2020. Esta decisão foi estritamente motivada pelo seu papel proeminente na prática clínica dentária. O uso extensivo de amoxicilina (frequentemente preferida na sua formulação associada ao ácido clavulânico) e a sua prescrição de rotina para a profilaxia da endocardite induzem uma intensa pressão seletiva sobre a microbiota residente (21, 36, 39). Além disso, a maior resistência à clindamicina evidenciada pelo *S. aureus* e a elevada prevalência de resistência aos macrólidos (como a eritromicina) nos CoNS podem refletir uma adaptação ecológica impulsionada pelo uso destes fármacos como principais alternativas terapêuticas em doentes com alergia à penicilina (32, 40).

O uso injustificado destes antibióticos, por vezes sem indicação clínica clara (como para a pulpite irreversível), potencia a troca horizontal de genes de resistência no contexto dos biofilmes orais, favorecendo a emergência de microrganismos tipicamente simbióticos, como *S. epidermidis* e *S. pasteurii*, em potenciais reservatórios e disseminadores de resistência com impacto em futuras falhas terapêuticas (35, 36, 39).

A análise comparativa dos perfis de resistência antimicrobiana entre os dois nichos anatómicos reforça ainda mais a importância clínica do ecossistema oral. Como demonstrado, a cavidade oral atua como um reservatório de resistência antimicrobiana tão importante como o meio nasal, não se observando diferenças

estatisticamente significativas nas frequências de resistência e multirresistência em todas as espécies identificadas. Apesar disso, os protocolos clínicos padrões tradicionalmente concentram-se principalmente nas narinas anteriores para o rastreio e descolonização de *Staphylococcus* (particularmente para prevenir infecções por MRSA), enquanto a colonização oral permanece amplamente negligenciada e descontrolada (23, 41). Consequentemente, esta falta de vigilância oral realça ainda mais o papel da cavidade oral como um reservatório silencioso, facilitando a disseminação contínua das características de resistência antimicrobiana na comunidade (23). A presença de populações de *Staphylococcus* resistentes e potencialmente persistentes na cavidade oral reforça a importância de considerar este nicho. Coletivamente, estas descobertas destacam o valor potencial da cavidade oral como um nicho ecológico complementar para a monitorização da resistência antimicrobiana na comunidade. A presença de populações de *Staphylococcus* resistentes em indivíduos saudáveis reforça ainda mais a importância do uso prudente de antibióticos e da vigilância contínua das comunidades microbianas orais.

A avaliação longitudinal da dinâmica de colonização indicou um contraste ecológico entre *S. warneri* e *S. aureus* dentro do mesmo nicho anatómico, destacando diferentes estratégias de adaptação. Os resultados demonstraram que *S. warneri* exibe uma acentuada instabilidade intra-individual e uma rápida renovação do perfil ao longo do tempo. A ausência de agrupamento específico da estirpe entre os pontos de amostragem sugere que esta espécie atua essencialmente como um colonizador transitório. O ambiente da cavidade oral pode não favorecer a persistência a longo prazo, não só devido a mecanismos de eliminação, como o fluxo salivar, a mastigação, a descamação da mucosa e as práticas de higiene, mas possivelmente também à forte pressão competitiva exercida pela microbiota residente, amplamente dominado por *Streptococcus* spp. (11, 21, 42).

Em contraste, a espécie *S. aureus* apresentou uma dinâmica evolutiva mais heterogênea e complexa. A identificação de subpopulações capazes de persistência sugere que a cavidade oral pode atuar como um reservatório viável para esta espécie, apesar de não ser um membro clássico do microbioma oral primário (22, 23). Esta estabilidade ecológica pode refletir características

adaptativas específicas da espécie, que podem incluir uma maior capacidade de adesão epitelial, a invasão de nichos específicos e a integração em biofilmes multiespécie, permitindo-lhe escapar à resposta imunitária local e à remoção mecânica normal pela saliva (9, 25, 26).

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser reconhecidas. A amostra foi constituída exclusivamente por estudantes de medicina dentária de uma única instituição, o que pode limitar a generalização dos resultados. Apenas um subconjunto de 31 participantes foi acompanhado longitudinalmente, reduzindo a robustez das conclusões sobre a colonização persistente versus transitória. Além disso, a análise ao nível da estirpe foi restrita a *S. aureus* e *S. warneri* para garantir tanto a relevância clínica como a viabilidade analítica. O *S. aureus* foi selecionado devido à sua importância clínica bem estabelecida, enquanto o *S. warneri* foi incluído como uma espécie representativa de *Staphylococcus* coagulase-negativo com um número suficiente de isolados para permitir a análise longitudinal. Outras espécies, como *S. epidermidis*, não foram incluídas devido ao elevado número de isolados, que excedeu a capacidade prática da análise por FTIR no âmbito deste estudo. Além disso, a metodologia baseou-se no isolamento por cultura em meio seletivo, em vez da utilização de metodologias *high-throughput*, como a sequenciação metagenómica, o que limitou a caracterização abrangente da comunidade bacteriana presente em cada indivíduo.

Apesar destas limitações, os resultados sugerem que a cavidade oral atua como um reservatório relevante e ativo para espécies de *Staphylococcus* resistentes aos antimicrobianos, realçando a sua importância para a vigilância e controlo de infeções na comunidade.

5. CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Este estudo destaca a cavidade oral como um nicho frequentemente colonizado por espécies de *Staphylococcus*, contrariando a perspectiva de que a sua presença neste ambiente seja apenas transitória. A elevada taxa de colonização oral e a sobreposição substancial com a cavidade nasal sugerem que a cavidade oral pode atuar como um reservatório relevante em indivíduos saudáveis, independentemente do estado de saúde oral. Notavelmente, esta colonização foi associada a uma resistência antimicrobiana considerável, particularmente entre os *Staphylococcus* coagulase-negativos, sublinhando a importância do uso prudente de antibióticos e da vigilância dos perfis de resistência. A análise longitudinal sugeriu ainda dinâmicas de colonização específicas para cada espécie, tendo sido observados padrões transitórios para *S. warneri* e indícios de persistência de perfis de estirpes semelhantes para *S. aureus* num subconjunto de indivíduos.

REFERÊNCIAS

1. Krishnan K, Chen T, Paster BJ. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Dis.* 2017;23(3):276-86.
2. Baker JL, Mark Welch JL, Kauffman KM, McLean JS, He X. The oral microbiome: diversity, biogeography and human health. *Nat Rev Microbiol.* 2024;22(2):89-104.
3. Azevedo MJ, Kaan AM, Costa C, Sampaio-Maia B, Zaura E. Acquisition of the Oral Microbiome. *Adv Exp Med Biol.* 2025;1472:13-29.
4. Wade WG. Resilience of the oral microbiome. *Periodontol* 2000. 2021;86(1):113-22.
5. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010;192(19):5002-17.
6. Li X, Liu Y, Yang X, Li C, Song Z. The Oral Microbiota: Community Composition, Influencing Factors, Pathogenesis, and Interventions. *Front Microbiol.* 2022;13:895537.
7. D'Ambrosio F, Santella B, Di Palo MP, Giordano F, Lo Giudice R. Characterization of the Oral Microbiome in Wearers of Fixed and Removable Implant or Non-Implant-Supported Protheses in Healthy and Pathological Oral Conditions: A Narrative Review. *Microorganisms.* 2023;11(4).
8. Berger D, Rakhamimova A, Pollack A, Loewy Z. Oral Biofilms: Development, Control, and Analysis. *High Throughput.* 2018;7(3).
9. Mosaddad SA, Tahmasebi E, Yazdanian A, Rezvani MB, Seifalian A, Yazdanian M, et al. Oral microbial biofilms: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38(11):2005-19.
10. Bowen WH. The Stephan Curve revisited. *Odontology.* 2013;101(1):2-8.
11. Sampaio-Maia B, Caldas IM, Pereira ML, Pérez-Mongiovi D, Araujo R. The Oral Microbiome in Health and Its Implication in Oral and Systemic Diseases. *Adv Appl Microbiol.* 2016;97:171-210.
12. Madhaiyan M, Wirth JS, Saravanan VS. Phylogenomic analyses of the Staphylococcaceae family suggest the reclassification of five species within the genus *Staphylococcus* as heterotypic synonyms, the promotion of five

subspecies to novel species, the taxonomic reassignment of five *Staphylococcus* species to *Mammaliicoccus* gen. nov., and the formal assignment of *Nosocomiicoccus* to the family Staphylococcaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020;70(11):5926-36.

13. Göker M, Christensen H, Fingerle V, Kostovski M, Margos G, Moore ERB, et al. List of Recommended Names for bacteria of medical importance: report of the Ad Hoc Committee on Mitigating Changes in Prokaryotic Nomenclature. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2025;75(10).

14. Hirose M, Aung MS, Fujita Y, Sakakibara S, Minowa-Suzuki E, Otomo M, et al. Prevalence, genetic characteristics, and antimicrobial resistance of staphylococcal isolates from oral cavity and skin surface of healthy individuals in northern Japan. *J Infect Public Health*. 2024;17(8):102488.

15. Wang X. Spa Typing of *Staphylococcus aureus* Isolates. *Methods Mol Biol*. 2020;2069:89-94.

16. Sakr A, Brégeon F, Mège JL, Rolain JM, Blin O. *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. *Front Microbiol*. 2018;9:2419.

17. Fumio Nagahama OT, Satoshi Uchibori, and Masahiko Fukumoto. Frequency of Staphylococci in Oral Cavity of Healthy Medical Workers. *International Journal of Oral-Medical Sciences*. 2013;12:35-40.

18. B N, Narayanarao G, T RS, B RS, Chandrasekaran D, Rakeeba F, Sr. Oral Commensals in Healthy Individuals: A Clinicocytological Study. *Cureus*. 2024;16(7):e65317.

19. Garbacz K, Wierzbowska M, Kwapisz E, Kosecka-Strojek M, Bronk M, Saki M, et al. Distribution and antibiotic-resistance of different *Staphylococcus* species identified by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) isolated from the oral cavity. *J Oral Microbiol*. 2021;13(1):1983322.

20. Heilmann C, Ziebuhr W, Becker K. Are coagulase-negative staphylococci virulent? *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(9):1071-80.

21. Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *J Med Microbiol*. 2001;50(11):940-6.

22. Campos J, Pires MF, Sousa M, Campos C, da Costa C, Sampaio-Maia B. Unveiling the Relevance of the Oral Cavity as a *Staphylococcus aureus*

Colonization Site and Potential Source of Antimicrobial Resistance. *Pathogens*. 2023;12(6).

23. Chmielewski M, Załachowska O, Komandera D, Albert A, Wierzbowska M, Kwapisz E, et al. The Oral Cavity-Another Reservoir of Antimicrobial-Resistant *Staphylococcus aureus*? *Antibiotics* (Basel). 2024;13(7).

24. Zaatout N. Presence of non-oral bacteria in the oral cavity. *Arch Microbiol*. 2021;203(6):2747-60.

25. Schilcher K, Horswill AR. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2020;84(3).

26. Idrees M, Sawant S, Karodia N, Rahman A. *Staphylococcus aureus* Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(14).

27. Radaic A, Kapila YL. The oralome and its dysbiosis: New insights into oral microbiome-host interactions. *Comput Struct Biotechnol J*. 2021;19:1335-60.

28. Sedghi L, DiMassa V, Harrington A, Lynch SV, Kapila YL. The oral microbiome: Role of key organisms and complex networks in oral health and disease. *Periodontol 2000*. 2021;87(1):107-31.

29. Kranjec C, Morales Angeles D, Torrissen Mårli M, Fernández L, García P, Kjos M, et al. Staphylococcal Biofilms: Challenges and Novel Therapeutic Perspectives. *Antibiotics* (Basel). 2021;10(2).

30. Costa RC, Bertolini M, Costa Oliveira BE, Nagay BE, Dini C, Benso B, et al. Polymicrobial biofilms related to dental implant diseases: unravelling the critical role of extracellular biofilm matrix. *Crit Rev Microbiol*. 2023;49(3):370-90.

31. Sharma S, Chauhan A, Ranjan A, Mathkor DM, Haque S, Ramniwas S, et al. Emerging challenges in antimicrobial resistance: implications for pathogenic microorganisms, novel antibiotics, and their impact on sustainability. *Front Microbiol*. 2024;15:1403168.

32. Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens*. 2021;10(10).

33. Wielders CL, Fluit AC, Brisse S, Verhoef J, Schmitz FJ. *mecA* gene is widely disseminated in *Staphylococcus aureus* population. *J Clin Microbiol*. 2002;40(11):3970-5.

34. Rybak B, Werbowy O, Debowski K, Plotka M, Kocot AM. Coagulase-Negative Staphylococci Determined as Blood Culture Contamination Have High

Virulence Characteristic Including Transfer of Antibiotic Resistance Determinants to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Int J Mol Sci*. 2025;26(9).

35. Roberts AP, Mullany P. Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010;8(12):1441-50.

36. Albuquerque I, Melo P, Azevedo Á. Antibiotic prescription habits of Portuguese oral healthcare professionals: an exploratory study. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*. 2025;66(3):130-7.

37. Donkor ES, Kotey FC. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Oral Cavity: Implications for Antibiotic Prophylaxis and Surveillance. *Infect Dis (Auckl)*. 2020;13:1178633720976581.

38. Yue H, Shen P, Huang Q, Lin S, Shen J, Wang Y, et al. Associations Between Dietary Habits, Oral Microbiota, and Dental Caries in Adolescents. *Phenomics*. 2025;5(6):633-45.

39. Saúde D-Gd. Norma 010/2014 - Prescrição de Antibióticos em Patologia Dentária. Direção-Geral da Saúde; 2014.

40. Alavi SE, Ebrahimi Shahmabadi H, Sharma LA, Sharma A. The Role of the Oral Microbiome in Periodontal Disease: A Systematic Review of Microbial Associations and Therapeutic Implications. *Curr Microbiol*. 2025;83(1):64.

41. Kearney A, Kinnevey P, Shore A, Earls M, Poovelikunnel TT, Brennan G, et al. The oral cavity revealed as a significant reservoir of *Staphylococcus aureus* in an acute hospital by extensive patient, healthcare worker and environmental sampling. *J Hosp Infect*. 2020.

42. Akimbekov NS, Digel I, Yerezhepov AY, Shardarbek RS, Wu X, Zha J. Nutritional factors influencing microbiota-mediated colonization resistance of the oral cavity: A literature review. *Front Nutr*. 2022;9:1029324.

MATERIAL SUPPLEMENTAR

Tabela 1S: Diretrizes adotadas para a avaliação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana em isolados de *Staphylococcus* spp.

<i>Staphylococcus</i> species	Antibiotic									
	AMO	CXI	CIP	CHL	GEN	TET	TRS	ERY	CLI	QUD
<i>Staphylococcus aureus</i>	CLSI 2020	ECOFF	ECOFF	ECOFF	ECOFF	ECOFF	ECOFF	ECOFF	ECOFF	ECOFF
<i>Staphylococcus capitis</i>	CLSI 2020	TECOFF	EUCAST	CLSI	TECOFF	EUCAST	TECOFF	TECOFF	TECOFF	na
<i>Staphylococcus carnosus</i> group	CLSI 2020	EUCAST	EUCAST	CLSI	EUCAST	EUCAST	EUCAST	EUCAST	EUCAST	na
<i>Staphylococcus cohnii</i>	CLSI 2020	EUCAST	EUCAST	CLSI	EUCAST	EUCAST	EUCAST	EUCAST	EUCAST	na
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CLSI 2020	ECOFF	EUCAST	CLSI	ECOFF	EUCAST	EUCAST	EUCAST	ECOFF	na
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	CLSI 2020	EUCAST	EUCAST	CLSI	EUCAST	EUCAST	EUCAST	EUCAST	EUCAST	na
<i>Staphylococcus hominis</i>	CLSI 2020	ECOFF	EUCAST	CLSI	ECOFF	EUCAST	ECOFF	EUCAST	TECOFF	na
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	CLSI 2020	ECOFF	EUCAST	CLSI	EUCAST	EUCAST	TECOFF	ECOFF	ECOFF	na
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	CLSI 2020	EUCAST	EUCAST	CLSI	EUCAST	EUCAST	EUCAST	EUCAST	EUCAST	na
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	CLSI 2020	EUCAST	EUCAST	CLSI	EUCAST	EUCAST	EUCAST	EUCAST	EUCAST	na
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	CLSI 2020	EUCAST	ECOFF	CLSI	EUCAST	EUCAST	EUCAST	EUCAST	EUCAST	na
<i>Staphylococcus warneri</i>	CLSI 2020	EUCAST	EUCAST	CLSI	EUCAST	EUCAST	EUCAST	EUCAST	EUCAST	na

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute; EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; ECOFF, Valor de corte epidemiológico; TECOFF, Valor de corte epidemiológico provisório; na, não aplicável; AMO, Amoxicilina; CXI, Cefoxitina; CIP, Ciprofloxacina; CHL, Cloranfenicol; GEN, Gentamicina; TET, Tetraciclina; TRS, Trimetoprima-sulfametoxazol; ERY, Eritromicina; CLI, Clindamicina; QUD, Quinupristina-dalfopristina.

Tabela 2S: Distribuição das espécies de *Staphylococcus* entre isolados obtidos de amostras das cavidades oral e nasal.

<i>Staphylococcus</i> spp.	Total		Oral		Nasal	
	n	%	n	%	n	%
<i>Isolados totais</i>	364	100%	161	100%	203	100%
<i>Staphylococcus aureus</i>	51	14.0%	24	14.9	27	13.3%
<i>Staphylococcus capitis</i>	29	8.0%	7	4.4%	22	10.8%
<i>Staphylococcus cohnii</i>	2	0.6%	1	0.6%	1	0.5%
<i>Staphylococcus carnosus</i> group	1	0.3%	1	0.6%	0	0.0%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	171	47.0%	80	49.7%	91	44.8%
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	6	1.7%	3	1.7%	3	1.5%
<i>Staphylococcus hominis</i>	6	1.7%	2	1.2%	4	2.0%
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	6	1.7%	2	1.2%	4	2.0%
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	15	4.1%	11	6.8%	4	2.0%
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	2	0.6%	2	1.2%	0	0.0%
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	23	6.3%	6	3.7%	17	8.4%
<i>Staphylococcus warneri</i>	52	14.3%	22	13.7%	30	14.8%

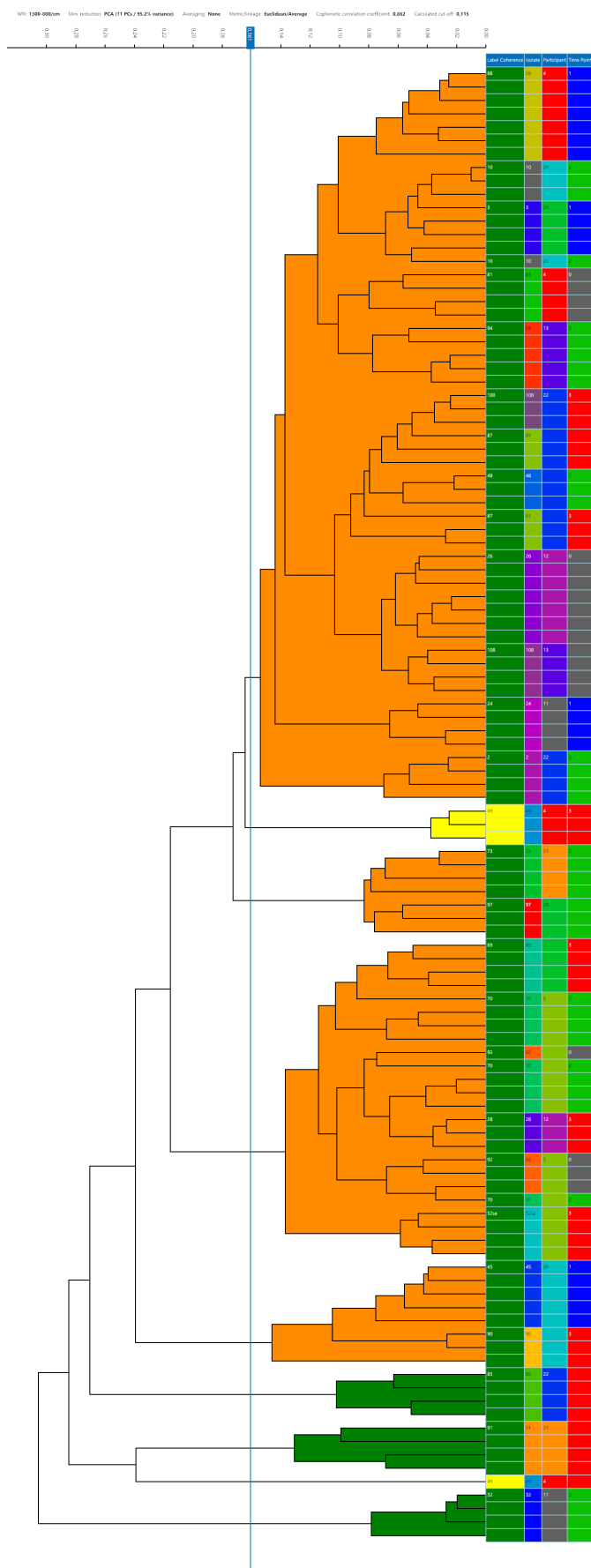


Figura 2S: Dendrograma representativo do agrupamento hierárquico de isolados de *S. aureus*.