



**Politécnico
Castelo Branco**

Escola Superior de Saúde
Dr. Lopes Dias

Prevalência de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) em superfícies de alto contacto na Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias

Wilma Salvador Nhaga Intumbo

4º ano de Licenciatura em Ciências Biomédicas Laboratoriais

Orientadora

Professora Doutora Carina Valente

Trabalho de Projeto apresentado à Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciatura, realizada sob a orientação científica da professora Doutora Carina Valente, do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Julho 2025

Composição do júri

Presidente do júri

Professora Doutora, Marisa Regina Reduto Santos Barbeira

Professora Adjunta, Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias

Vogais

Professor Doutor, Francisco José Barbas Rodrigues (arguente)

Professor Adjunto, Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias

Professora Doutora, Carina Alexandra Pereira Valente (orientadora)

Professora Adjunta, Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias

Agradecimentos

A realização deste trabalho final de curso não teria sido possível sem o apoio e contribuição de várias pessoas e instituições, às quais expresso os meus sinceros agradecimentos.

À Professora Doutora Carina Valente, orientadora deste projeto, pela orientação científica, disponibilidade constante, paciência e pelos valiosos conhecimentos transmitidos ao longo de todo o processo. A sua experiência e rigor científico foram fundamentais para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

À Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, na pessoa da sua Diretora, por ter autorizado a realização deste estudo nas suas instalações, demonstrando o compromisso da instituição com a investigação científica e a melhoria contínua das práticas de saúde. Pela forma calorosa como fui acolhida nesta instituição e nesta cidade, que se tornou a minha segunda casa.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação académica, pela transmissão de conhecimentos, pela dedicação ao ensino e por contribuírem para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Professor Doutor Francisco Rodrigues, pela generosa cedência dos meios de cultura essenciais para a realização da componente experimental deste trabalho, demonstrando o espírito de colaboração e partilha que caracteriza a comunidade científica.

Aos técnicos e colaboradores do laboratório, pelo apoio técnico prestado durante a fase experimental, pela partilha de conhecimentos práticos e pela disponibilidade auxiliar no que for necessário.

Às instituições onde realizei os meus estágios e a todos os profissionais que me acompanharam, pela oportunidade de aprendizagem prática, pela paciência em ensinar, pela partilha de experiências e pelo exemplo de profissionalismo demonstrado. Estas experiências foram fundamentais para a minha formação e para a compreensão da realidade profissional.

À minha família, em especial aos meus pais, pela compreensão e incentivo ao longo de toda a minha formação académica. Pelo imenso sacrifício de emigrar para um novo país, deixando para trás familiares, amigos e uma vida construída, tudo em nome de proporcionar melhores oportunidades aos filhos. Por colocarem sempre os filhos em primeiro lugar, renunciando aos vossos próprios sonhos e confortos para que pudéssemos alcançar os nossos objetivos. A vossa dedicação, amor incondicional e determinação são exemplos que levarei sempre comigo. Aos meus irmãos, pela cumplicidade, pelos momentos de descontração que aliviaram o stress dos estudos e pela motivação constante. O vosso apoio e as vossas palavras de incentivo foram uma fonte de força fundamental durante todo este processo académico. Sem o vosso suporte, este percurso não teria sido possível.

Aos meus amigos, por todos os momentos partilhados ao longo desta jornada. Pelas palavras de encorajamento nos momentos mais desafiantes e por celebrar as pequenas conquistas. Por acreditarem sempre nas minhas capacidades, mesmo quando eu próprio duvidava, o vosso apoio incondicional foi fundamental para ultrapassar os obstáculos ao longo deste percurso académico. A vossa amizade é um presente que levarei comigo para toda a vida.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu sincero obrigado/a.

Resumo

Introdução: *Staphylococcus aureus* é uma bactéria comum na flora humana, mas com potencial para causar infeções graves em contextos hospitalares e comunitários. A sua transmissão pode ocorrer entre pessoas ou através de superfícies contaminadas, onde consegue sobreviver por longos períodos. A variante resistente à meticilina (MRSA) representa um sério problema de saúde pública, sobretudo em Portugal, onde as taxas são superiores à média europeia. Este estudo tem como principal objetivo avaliar a prevalência de MRSA na Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias.

Metodologia: Foram amostradas superfícies de alto contato da ESALD com recurso a compressas estéreis humedecidas em soro fisiológico que foram depois inoculadas em meio semi-seletivo para MRSA e incubadas durante 24h a 37 °C. Extraíu-se DNA a partir de amostras positivas através do método *boiling out*. Foram realizados PCRs para identificação de *S. aureus* (*nuc* + *femA*) e de MRSA (*mecA* e *mecC*). Confirmações adicionais por métodos fenotípicos, quando necessárias, incluíram fermentação de manitol, crescimento em meios comogénicos e o teste da coagulase.

Resultados: Vinte por cento (4/20) das amostras analisadas são *S. aureus* dos quais 50% são MRSA (2/4) o total de MRSA representa 10% (2/20) das amostras totais. Todos os MRSA apresentaram o gene de resistência *mecA*.

Conclusão: Os resultados mostram que a ESALD pode atuar como um reservatório de MRSA e evidenciam a necessidade de adotar medidas rigorosas de higienização, vigilância e formação contínua em prevenção de infeções, de forma a reduzir o risco de disseminação de MRSA em instituições de ensino superior na área da saúde.

Palavras Chaves: MRSA, superfícies de alto contacto, PCR, Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias

Abstract

Introduction: *Staphylococcus aureus* is a common bacterium in the human flora but has the potential to cause severe infections in both hospital and community settings. It can be transmitted between individuals or via contact with contaminated surfaces, where it is capable of surviving for extended periods. The methicillin-resistant variant (MRSA) represents a serious public health concern, especially in Portugal, where rates are higher than the European average. This study aims to assess the prevalence of MRSA at the Dr. Lopes Dias School of Health (ESALD).

Methodology: High-contact surfaces at ESALD were sampled using sterile gauzes moistened with saline solution. These were then inoculated on semi-selective media for MRSA and incubated for 24 hours at 37 °C. DNA was extracted from positive samples using the boiling out method. PCRs were performed to identify *S. aureus* (*nuc* + *femA*) and MRSA (*mecA* and *mecC*). When necessary, additional phenotypic confirmation methods included mannitol fermentation, growth on chromogenic media, and the coagulase test.

Results: Twenty percent (4/20) of the samples tested positive for *S. aureus*, of which 50% (2/4) were identified as MRSA. Overall, MRSA was detected in 10% (2/20) of the total samples. All MRSA strains carried the *mecA* resistance gene.

Conclusion: The results indicate that ESALD may act as a reservoir for MRSA, highlighting the need for strict hygiene protocols, surveillance, and ongoing infection prevention training to reduce the risk of MRSA transmission in higher education institutions within the health sector.

Keywords: MRSA, high-contact surfaces, PCR, Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias

Índice geral

Composição do júri.....	II
Agradecimentos	IV
Resumo	VII
Abstract	VIII
Introdução	1
Metodologia.....	2
Extração de DNA	2
PCR para identificação de <i>S. aureus</i> e MRSA.....	3
Eletroforese.....	4
Cultura	5
Teste Coagulase	5
Resultados	5
Discussão.....	11
Conclusão	13
Referências Bibliográficas	14

Índice de figuras

Figura 1 – Resultado do PCR para identificação de <i>S. aureus</i> por amplificação dos genes <i>nuc</i> e <i>femA</i>	7
Figura 2 – Resultado do PCR para identificação de MRSA por amplificação do gene <i>mecA</i>	8
Figura 3 – Resultado do PCR para identificação de MRSA por amplificação do gene <i>mecC</i>	8
Figura 4 – Placas de cultura para isolamento de MRSA putativos a partir das amostras <i>mecA</i> positivas.....	9
Figura 5 – Resultado do PCR para identificação de <i>S. aureus</i> por amplificação de <i>nuc</i> e <i>fem A</i> e MRSA por amplificação do gene <i>mecA</i> e <i>mecC</i> ..	10

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Estirpes e primers utilizados no estudo	4
Tabela 2 – Qualidade e quantidade do DNA extraído das amostras e controlos....	6

Introdução

O *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) é uma bactéria da flora humana com potencial patogénico. Pode ser encontrada nas cavidades nasais, pele, cavidade oral, trato respiratório superior, trato urinário inferior e trato gastrointestinal (1). Coloniza permanentemente entre 25% a 35% da população (2) e cerca de 60% é colonizada de forma transitória (1). Este microrganismo pode causar uma ampla gama de doenças, tanto hospitalares quanto comunitárias (1).

A transmissão do *S. aureus* pode ocorrer de pessoa para pessoa, de reservatórios para pessoas e do ambiente para pessoas. Indivíduos contaminados, sintomáticos ou não, e colonizados, podem disseminar a bactéria para superfícies ao seu redor, onde esta pode sobreviver por longos períodos, contaminando pele, roupa, entre outros (3).

O *S. aureus* está associado a infeções gravíssimas como sépsis (1), pneumonia necrosante (3), infeções de tecidos moles e endocardite (4). Possui diversos fatores de virulência que favorecem a resistência em ambientes extremos e a variedade de doenças causadas, como formação de biofilmes, produção de enterotoxinas, hemólises, exotoxinas, proteína A, toxina da síndrome do choque tóxico 1 e leucocidina de Panton-Valentine (5).

O uso excessivo de antibióticos levou, em 1961, ao surgimento do *S. aureus* resistente à metilina (MRSA), apenas dois anos após a introdução da metilina como substituta da penicilina (3). A resistência decorre da aquisição do gene *mecA* (por transferência horizontal do elemento genético móvel *SSCmec*), que codifica a proteína PBP2a, uma enzima que realiza a ligação cruzada dos peptidoglicanos da parede celular bacteriana. A PBP2a possui baixa afinidade para β -lactâmicos, permitindo a sobrevivência da bactéria mesmo na presença destes antibióticos, conferindo resistência a toda a classe (6).

As infeções por MRSA classificam-se em MRSA associado à comunidade (CA-MRSA) e MRSA associado ao hospital (HA-MRSA). O CA-MRSA refere-se à infeção sem história de hospitalização ou exposição a cuidados de saúde, enquanto o HA-MRSA é adquirido após internamento ou contato hospitalar (5).

O MRSA é um grave problema de saúde pública. Na Europa, a frequência de MRSA de origem invasiva é cerca de 15,2%. Em Portugal, em 2015, a taxa de MRSA era 46,9%, uma das mais elevadas da Europa, tendo tido um declínio para 25% em 2022. Apesar da queda, Portugal mantinha uma das taxas mais elevadas da União Europeia, passando da terceira posição em 2015 para a sétima em 2022, ainda acima da média europeia (7). Embora o número de infeções seja elevado, a prevalência de MRSA na comunidade em Portugal é baixa (8)(9)(10).

Os estabelecimentos de ensino superior com cursos de saúde constituem um ambiente de elevada promiscuidade entre o ambiente hospitalar e a comunidade (11). O contato de alunos e professores com unidades de saúde pode aumentar o risco de colonização por MRSA. Assim, este trabalho visa analisar a prevalência de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias. Pretende-se avaliar o potencial da escola como reservatório de MRSA, com possível disseminação entre a comunidade e hospitais.

Metodologia

Colheita das amostras e enriquecimento seletivo

Foram colhidas 20 amostras na Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias. As amostras foram agrupadas de acordo com o local de colheita: bar (mesas, costas das cadeiras e balcão), corrimão das escadas, porta de acesso à varanda (maçanetas), salas de aula (mesas e costas das cadeiras), casas de banho dos alunos, bar e docentes (maçanetas dos cubículos, torneiras e descargas dos urinóis), multibanco (botões), elevador (botões), máquina de venda automática (botões) e auditório (mesas). Nas salas de aulas, devido ao elevado número de mesas e cadeiras, foram selecionadas 4 mesas e 4 cadeiras aleatoriamente em cada sala.

A colheita foi realizada com compressas estéreis humedecidas em soro fisiológico, amostrando toda a área referida. As compressas foram imersas em erlenmeyers contendo 40 mL de caldo semi-seletivo para MRSA: triptona de soja suplementada com 2,5% NaCl, 3,5 mg/L de cefoxitina (ThermoScientific) e 20 mg/L de aztreonam (TCI)(12) As amostras foram incubadas em aerobiose durante 24 horas a 37 °C.

Extração de DNA

Para a extração de DNA das amostras 2 mL de cultura foram centrifugados a 13.600 rpm durante 3 minutos; o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 200 µL de tampão fosfato salino (PBS).

Foram adicionados 0,1 µg/µl de lisozima, e os tubos foram incubados no Thermomixer Compact (Eppendorf) a 37 °C durante 20 min. Para inativação da enzima os tubos foram incubados a 95 °C, durante 20 minutos com agitação, seguidos de uma incubação a -20 °C durante 20 min. Após centrifugação a 13.600 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi transferido para um tubo de 1.5mL identificado, o pellet descartado, e o DNA foi armazenado a -20 °C.

A extração dos controlos foi realizada a partir de placas de cultura. Realizou-se uma suspensão bacteriana com ¼ das colónias da placa em 1 mL de PBS. O restante protocolo foi igual ao descrito acima.

A qualidade e concentração do DNA foram avaliadas por espectrofotometria através da razão A260/A280 e A260/230, utilizando o NanoDrop.

PCR para identificação de *S. aureus* e MRSA

Antes de iniciar o protocolo do PCR foi adicionado a cada amostra um DNA de concentração e qualidade conhecidas, usado como controlo interno de inibidores da PCR (100ng de DNA de uma estirpe de *Streptococcus pneumoniae*). Esta estirpe foi escolhida por apresentar bons resultados para o par de primers escolhidos para amplificação do gene *16SrRNA*. Realizou-se a PCR visando a deteção dos genes *femA* (gene da aminoacetiltransferase FemA), *nuc* (gene da termonuclease), *16SrRNA* (gene da subunidade 16S do ribossoma, controlo interno), *mecA* (gene da PBP2a) e *mecC* (homólogo do *mecA*, associado à resistência à meticilina). A sequência dos primers utilizados foi previamente descrita por outros autores ((13), (14), (15)) e está representada na Tabela 1.

Foram realizadas três reações de PCR multiplex: a primeira para deteção de *S. aureus* (*femA*, *nuc* e *16SrRNA*), e as seguintes para deteção de MRSA, por amplificação dos genes *mecA* e *16SrRNA* e dos genes *mecC* e *16SrRNA*, respetivamente. A deteção de *mecA* e *mecC* foi realizada para amostras que amplificaram para pelo menos um dos genes identificativos de *S. aureus* (*femA* e *nuc*).

A mistura reacional continha: 0,4 µM de cada primer, exetando *femA* e *nuc* que foi 0,8 µM, 1 U/µl de Taq polimerase (Promega), 0,12 µM de dNTPs (NZYTech), tampão 1x (Promega), 2,5 µM de MgCl₂ (Promega), 1 µL de DNA e água milli-Q até completar o volume final de 10 µL.

A amplificação foi realizada com as seguintes condições no termociclador: 95 °C durante 5 minutos (desnaturação inicial), seguido de 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 50 °C (para *nuc*, *femA*, *16SrRNA*, *mecA* e *mecC*) por 40 segundos, e 72 °C por 3 minutos.

Foram utilizadas a estirpes listadas na Tabela 1 como controlos do PCR.

Tabela 1 – Estirpes e primers utilizados no estudo

Estirpe bacterianas		
Estirpe	Objetivo	Referência
ATCC14990 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Controlo negativo, coagulase negativo	ATCC
ATCC25933 <i>Staphylococcus aureus</i>	Controlo positivo para <i>nuc</i> e <i>femA</i>	ATCC
COL – MRSA (estirpe laboratorial)	Controlo positivo para <i>mecA</i>	
LGA251 – MRSA (isolado clínico)	Controlo positivo para <i>mecC</i>	
Oligonucleótidos		
Nome	Objetivo	Referência
femA_fw	Amplificação do gene da aminoaciltransferase FemA com produto de amplificação de 132pb Temperatura de <i>annealing</i> : 50°C	(11)
femA_rv		
nuc_fw	Amplificação do gene da termonuclease com produto de amplificação de 279pb Temperatura de <i>annealing</i> : 50°C	
nuc_rv		
16SrRNA_fw	Amplificação do gene da subunidade 16S do ribossoma com produto de amplificação de 522pb Temperatura de <i>annealing</i> : 50°C	(13)
16SrRNA_rv		
mecA_fw	Amplificação do gene da PBP2a com produto de amplificação de 105pb Temperatura de <i>annealing</i> : 50°C	(12)
mecA_rv		
mecC_fw	Amplificação do gene homólogo do <i>mecA</i> , associado à resistência à metilina com produto de amplificação de 87pb Temperatura de <i>annealing</i> : 50°C	
mecC_rv		

Eletroforese

Para todas as reações de PCR, os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%. Prepararam-se 100 mL de agarose 2% em tampão TAE, aos quais foram adicionados 3 µL de GreenSafe (NZYTech).

Após a polimerização do gel, este foi colocado na tina de eletroforese e coberto com TAE.

Foram adicionados os produtos de PCR com 1 µL de *loading dye* a cada poço e um marcador de peso molecular (1 Kb plus, ThermoFisher Scientific). A corrida foi realizada durante 1 hora e 30 minutos a 90 V.

A visualização foi feita por luz UV e o gel foi fotografado após o término da corrida.

Amostras com amplificação positiva para os genes *nuc*, *femA*, *16srRNA* foram consideradas positivas para *S. aureus*. As que adicionalmente *revelaram* positividade para *mecA* ou *mecC* foram consideradas positivas para MRSA.

Cultura

Realizou-se cultura para a confirmação de 4 amostras. O isolamento das bactérias foi realizado a partir do meio líquido, utilizando-se 10µl do meio para realizar as estrias em cada placa. Para cada amostra inoculou-se uma placa de agar cromogénico de *S. aureus* e uma de MRSA (Firilabo). Após incubar durante 24 horas a 37 °C em aerobiose as colónias características de MRSA no agar cromogénico de MRSA foram isoladas para o mesmo meio para posterior extração do DNA.

Teste Coagulase

O teste da coagulase foi executado nas 4 amostras mencionadas anteriormente. Para a realização do teste da coagulase utilizou-se o teste de aglutinação de latex do kit comercial SATPHYTEC PLUS (ThermoFisher Diagnostics) para a identificação de *S. aureus*. O teste foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

Resultados

Das 20 amostras colhidas em superfícies de alto contacto da ESALD, todas apresentaram crescimento bacteriano, pelo que se procedeu à extração do DNA das 20 amostras. A Tabela 2 apresenta os dados relativos à qualidade e quantidade do DNA das amostras, incluindo o DNA das colónias isoladas (ver em baixo) e estripes controlo. A qualidade do DNA foi avaliada com base na razão de absorvância 260/280 e 260/230 que permite avaliar a contaminação por proteínas, sendo o valor ideal situado entre 1,8 – 2,0. Embora a maioria das amostras apresentasse parâmetros de qualidade fora dos limites estabelecidos como ideais, as quantidades de DNA obtidas foram elevadas, permitindo a sua utilização no PCR.

Tabela 2 – Qualidade e quantidade do DNA extraído das amostras e controlos

Amostra	260/280	260/230	Quantidade (ng/μl)
Auditório			
Mesas	1,48	0,52	138,8
Bar			
Cadeiras	1,32	0,46	138,3
Mesas	1,87	1,03	296,4
Casas de Banho			
Bar – maçanetas	1,05	0,26	44,02
Bar – torneiras	1,95	1,15	406,6
Bar – urinóis	0,77	0,19	18,8
Alunos – maçanetas	1,47	0,59	222,9
Alunos – torneiras	0,97	0,25	61,4
Alunos – urinóis	0,92	0,23	55,5
Professores – maçanetas	1,70	0,71	176,5
Professores – torneiras	0,97	0,25	68,4
Professores – urinóis	0,83	0,20	23,8
Salas de aula			
Cadeira	1,04	0,28	64,5
Mesas	1,61	0,65	190,1
Outras superfícies			
Corrimão	1,6	0,66	207,5
Botões do elevador	1,56	0,62	113,8
Botões máquina de <i>vending</i>	1,75	0,93	3337,9
Botões do microondas	1,79	0,90	387,2
Botões do multibanco	1,63	0,62	177,2
Maçanetas das portas de acesso à varanda (bar e 1º piso)	1,25	0,35	71,6
Colónias isoladas			
Corrimão -isolado			
Salas cadeiras - isolado	2,25	1,60	1416,4
Salas mesas - isolado	2,25	1,70	1461,2
Controlos			
ATCC14990	2,07	1,29	817,8
ATCC25933	2,33	2,02	1931,9
MRSA COL	2,38	1,78	738,7
MRSA LGA251	2,30	1,92	1479,9

No PCR realizado para a identificação de *S. aureus* (Figura 1) foram usados como alvo os genes *nuc* e *femA* e o gene *16SrRNA* como controlo interno. Todas as amostras amplificaram a *16SrRNA* mostrando a ausência de inibidores da reação de PCR nos DNAs das amostras em estudo.

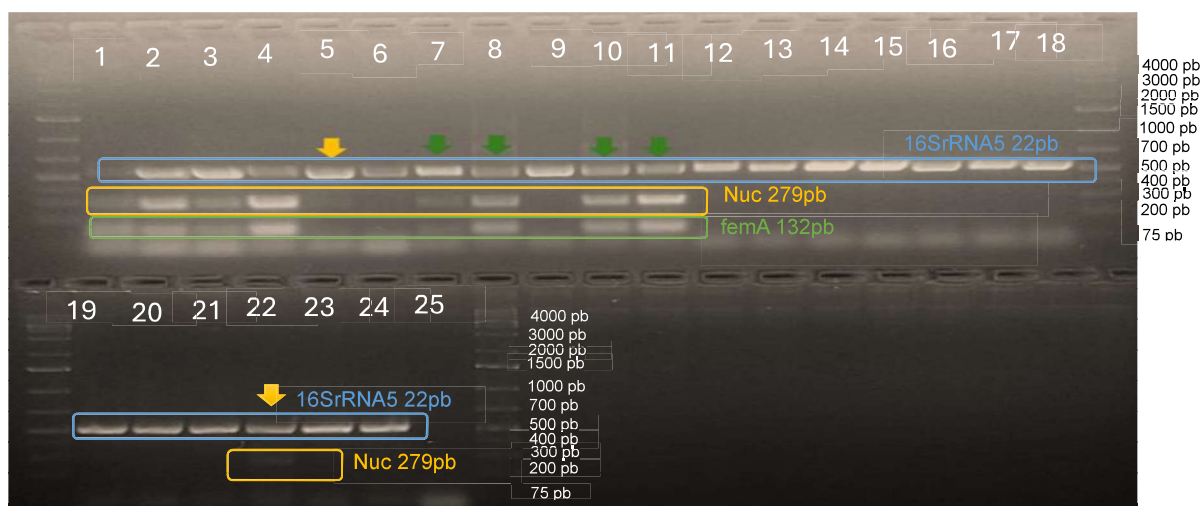


Figura 1 – Resultado do PCR para identificação de *S. aureus* por amplificação dos genes *nuc* e *femA*. 1 *S. aureus* ATCC25933; 2 *S. epidermidis* ATCC14990; 3 MRSA COL; 4 MRSA LGA251; 5 Botões elevadores; 6 maquina de vendas; 7 Multibanco; 8 Corrimão; 9 portas varandas; 10 Bar mesas; 11 Bar cadeiras; 12 Microondas; 13 Casa de banho bar torneiras; 14 Casa de banho bar maçanetas; 15 Casa de banho bar urinóis (autoclismo); 16 Casa de banho alunos torneiras; 17 Casa de banho alunos maçanetas; 18 Casa de banho alunos urinóis (autoclismos); 19 casa de banho professores (maçanetas); 20 casa de banho professores torneiras 21 casa de banho professores urinóis (autoclismo); 22 salas mesas; 23 salas cadeiras; 24 auditório mesas; 25 controlo negativo. Controlo interno: *16SrRNA*.

Os controlos da reacção amplificaram os três genes alvo, seis amostras amplificaram pelo menos um gene alvo: quatro amostras (identificadas com seta verde) amplificaram todos os genes alvo (resultado esperado para *S. aureus*) e duas amostras (identificadas com seta amarela) amplificaram os genes *16SrRNA* e *nuc*, mas não o gene *femA*. Contrariamente ao esperado, o controlo de coagulase negativos (*S. epidermidis*), amplificou os dois genes-alvo identificativos de *S. aureus*.

As seis amostras positivas para pelo menos um dos genes de *S. aureus* foram posteriormente submetidas a PCR para pesquisa de *mecA* e *mecC* (Figura 2 e 3, respetivamente). Com a exceção da estirpe ATCC25933 (*S. aureus*) todas as amostras amplificaram o controlo interno em ambos os PCRs. Quatro das seis amostras foram positivas para *mecA* (bar cadeiras, bar mesas, corrimão e sala cadeiras) e nenhuma positiva para *mecC*.

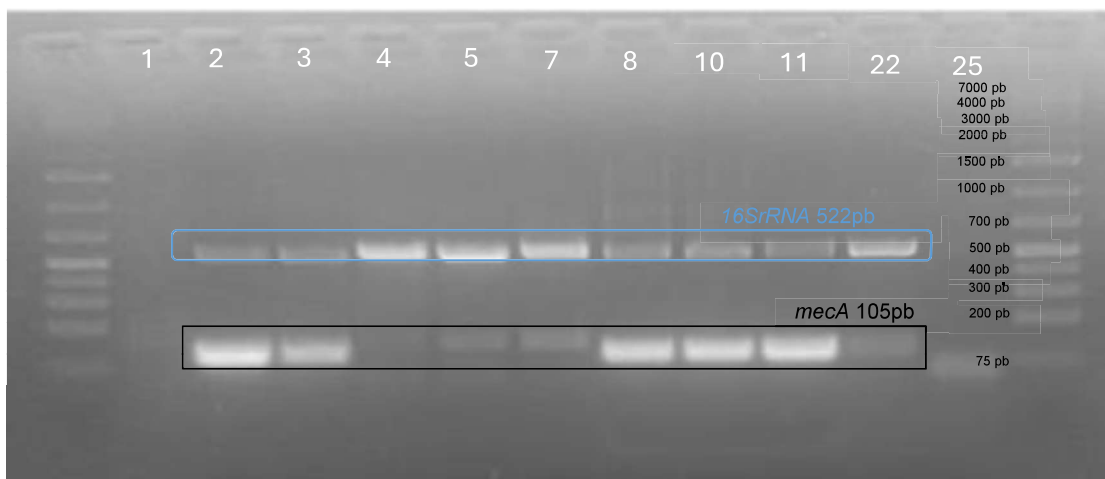


Figura 2 – Resultado do PCR para identificação de MRSA por amplificação do gene *mecA* 1 *S. aureus* ATCC25933; 2 *S. epidermidis* ATCC14990; 3 MRSA col; 4 MRSA LGA; 5 Botões elevadores; 7 Multibanco; 8 Corrimão; 10 Bar mesas; 11 Bar cadeiras; 22 salas mesas; 25 branco. Controlo interno: *16SrRNA*

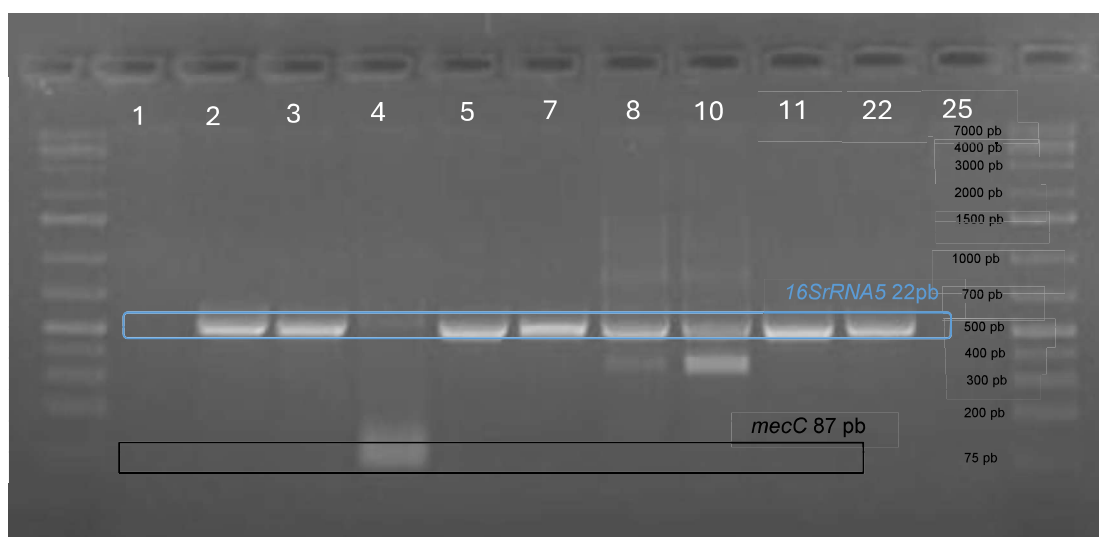


Figura 3 – Resultado do PCR para identificação de MRSA por amplificação do gene *mecC* 1 *S. aureus* ATCC25933; 2 *S. epidermidis* ATCC14990; 3 MRSA col; 4 MRSA LGA; 5 Botões elevadores; 7 Multibanco; 8 Corrimão; 10 Bar mesas; 11 Bar cadeiras; 22 salas mesas; 25 branco. Controlo interno: *16SrRNA*

Relativamente aos controlos, todos apresentaram o resultado esperado para os genes de resistência à meticilina: as amostras de *S. epidermidis* (coagulase negativo) e MRSA COL (controlo positivo para *mecA*) amplificaram *mecA* e a estirpe MRSA LGA251 (controlo positivo para *mecC*) amplificou *mecC*.

Uma vez que o DNA de *S. epidermidis* apresentou positividade para ambos os genes identificativos de *S. aureus*, procederam-se a confirmações adicionais nas quatro amostras positivas para *mecA*.

Todas as amostras inoculadas em em *manitol salt agar* apresentaram crescimento, mas apenas as colónias provenientes das amostras Salas-mesas e Salas-cadeiras induziram a alteração da coloração do meio de rosa para

amarelo (Figura 4A), sugerindo que as amostras Bar-mesas e Corrimão poderão não corresponder a *S. aureus*.

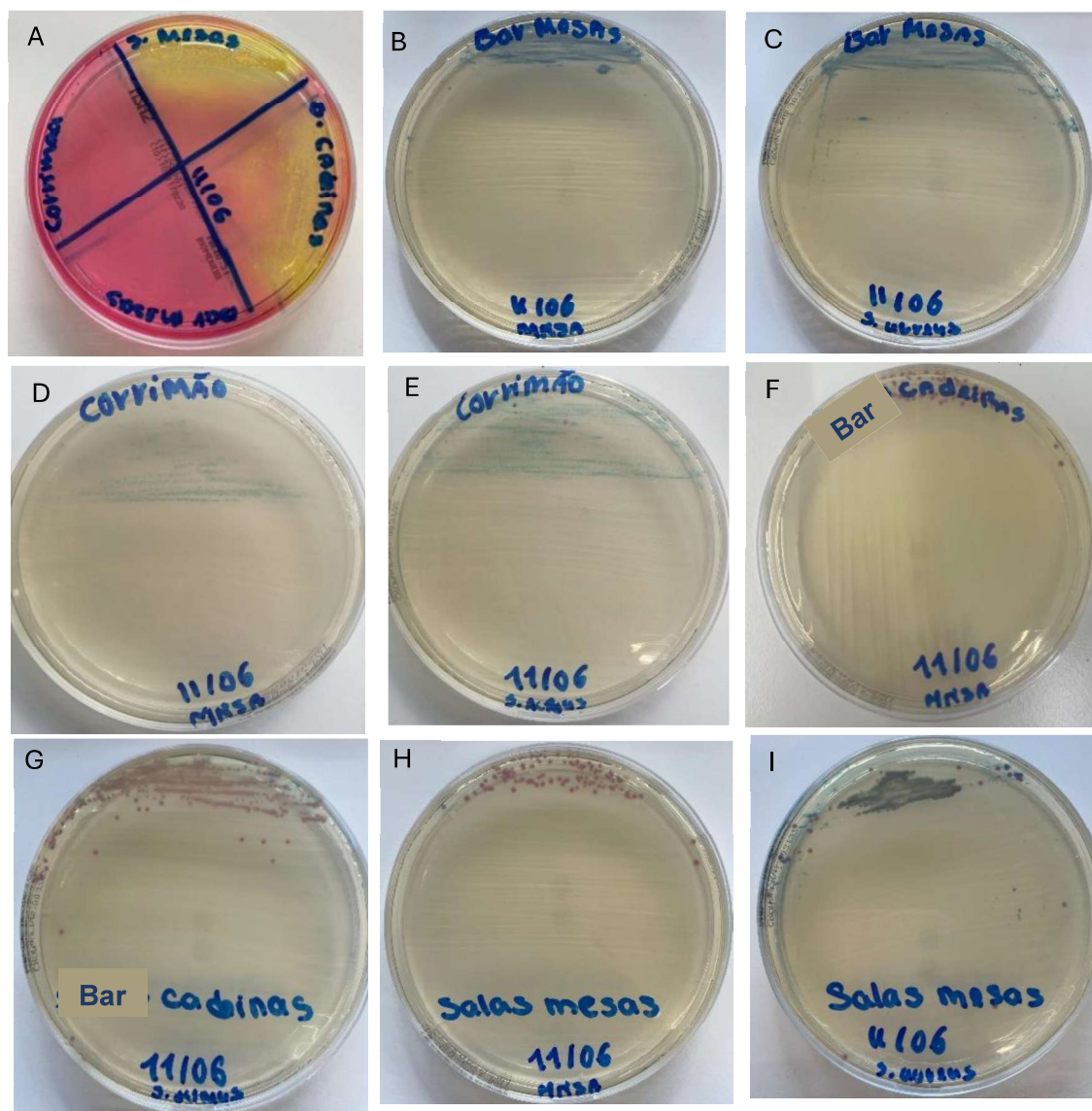


Figura 4 – Placas de cultura para isolamento de MRSA putativos a partir das amostras *mecA* positivas. (A) sala-mesas, sala-cadeiras, corrimão e bar-mesas em *manitol salt agar*; (B) bar mesas em agar cromogénico para *S. aureus*; (C) bar cadeiras em agar cromogénico para MRSA; (D) corrimão em agar cromogénico para MRSA; (E) corrimão em agar cromogénico para *S. aureus*; (F) salas-cadeiras em agar cromogénico para MRSA; (G) salas- cadeiras em agar cromogénico para *S. aureus*; (H) salas-mesas em agar cromogénico para MRSA; (I) salas-mesas em agar cromogénico para *S. aureus*. A presença de *S. aureus* e MRSA é indicada pelo crescimento de colónias rosa nos meios cromogénicos para deteção de *S. aureus* e MRSA, respetivamente.

Relativamente ao crescimento nos meios cromogénicos para identificação de *S. aureus* e MRSA, não foram observadas colónias características de *S. aureus* ou MRSA nas placas referentes a amostra Bar-mesas (Figura 4B e C)). A amostra proveniente do corrimão apresentava colónias características de *S.*

aureus, no entanto não houve crescimento na placa de MRSA (Figura 4D e E). As amostras Salas-mesas e Salas-cadeiras apresentavam colónias características de *S. aureus* (rosa) na placa de *S. aureus* e de MRSA nas placas de MRSA (Figura 4 F-I).

Nos PCRs realizados para as amostras isoladas (Figura 5) os controlos amplificaram todos os genes alvos para identificação de *S. aureus*. MRSA COL e MRSA LGA251 amplificaram o gene *mecA* e *mecC*, respetivamente, no PCR para identificação de MRSA. Dentre as amostras, as mostras Salas mesas e Salas cadeiras não amplificaram o controlo interno, a amostra sala mesas foi positivo para *femA* e negativo para o gene *nuc*. A amostra bar cadeiras foi positivo para *nuc* e *femA*. A amostra Corrimão amplificou os três genes alvo. Para identificação de MRSA, as amostras Salas mesas e Bar cadeiras amplificaram o gene de resistência *mecA* e nenhuma amostra amplificou *mecC*.

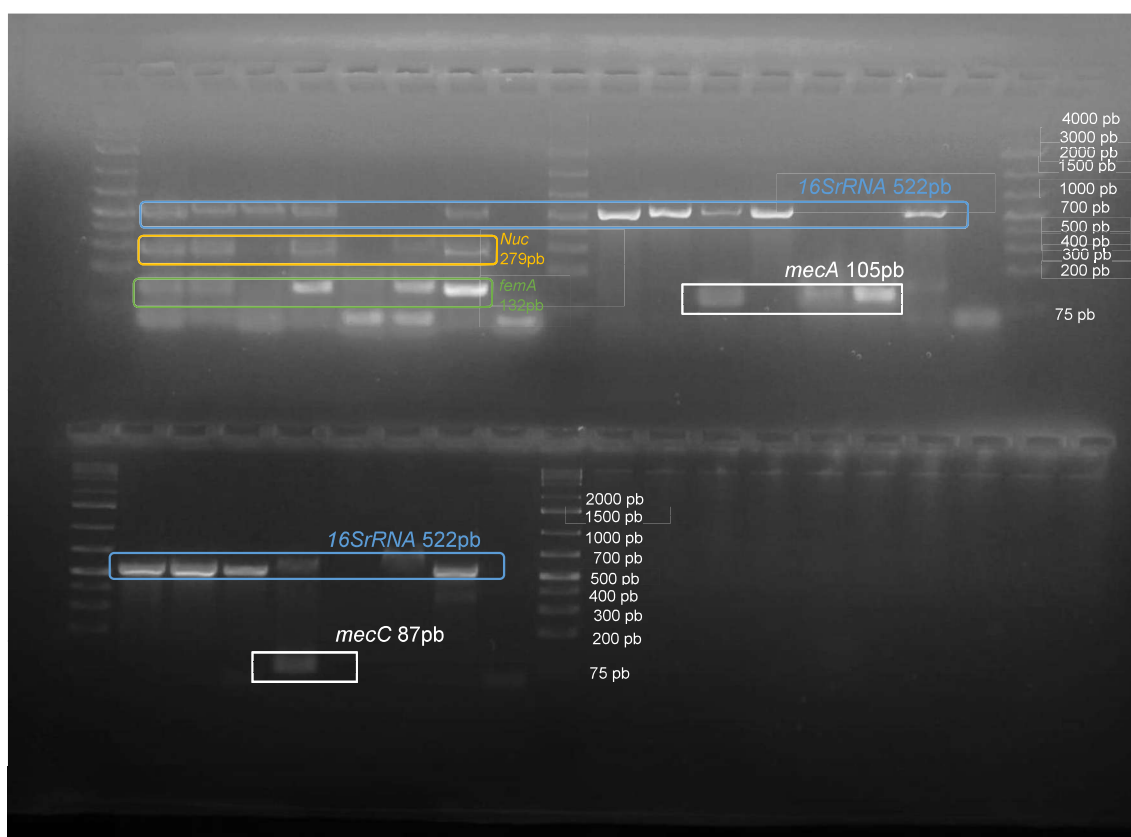


Figura 5 – Resultado do PCR para identificação de *S. aureus* por amplificação de *nuc* e *fem A* e MRSA por amplificação do gene *mecA* e *mecC*. 1 *S. aureus* ATCC25933; 2 *S. epidermidis* ATCC14990; 3 MRSA col; 4 MRSA LGA; 22 salas mesas; 11 Bar cadeiras; 8 Corrimão; 25 branco. Controlo interno: 16SrRNA.

Discussão

Os estabelecimentos de ensino superior que lecionam cursos na área da saúde representam um ambiente de elevada interligação entre o meio hospitalar e a comunidade. O contacto regular de alunos e docentes com unidades de saúde pode favorecer o risco de colonização por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar a prevalência de MRSA na Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, procurando avaliar o seu potencial enquanto reservatório deste agente, com possíveis implicações na sua disseminação entre a comunidade e os serviços de saúde.

A prevalência de *S. aureus* identificada neste estudo (20%, 4/20 amostras) é consistente com investigações internacionais em ambientes universitários. Os nossos resultados são comparáveis aos 22,2% reportados num estudo americano conduzido em superfícies de alto contacto universitárias (4). Contudo, a proporção de MRSA entre os isolados de *S. aureus* (10%, 2/20) foi superior aos 5,9% relatados no estudo americano. Esta diferença pode refletir as diferenças metodológicas entre estudos, características específicas da população estudantil ou as superfícies analisadas.

A comparação com o estudo realizado na Jordânia revelou prevalências inferiores às nossas: 14,6% para *S. aureus* e 2,78% para MRSA (5). As diferenças metodológicas são relevantes para esta comparação, uma vez que o estudo jordano utilizou identificação fenotípica inicial seguida de confirmação molecular, enquanto o presente trabalho empregou deteção molecular direta. Importa realçar que no estudo jordano, as maiores concentrações de MRSA foram detetadas em maçanetas e lavatórios de casas de banho, superfícies tradicionalmente associadas a maior carga microbiana, o que não se verificou no presente estudo.

Quatro amostras (elevador botões, multibanco, bar cadeiras e salas mesas) foram identificadas como *S. aureus* através de PCR, com confirmação posterior de MRSA nas amostras bar cadeiras e salas mesas pela presença do gene *mecA*. A ausência do gene *mecC* está em concordância com a literatura, dado que a prevalência de resistência à meticilina conferida por este gene é baixa (16).

As amostras elevador botões e salas mesas não amplificaram o gene *femA*, apesar de este estar presente em 72,5% a 100% dos isolados de *S. aureus* (13). Esta situação pode ser explicada por mutações nos locais de ligação dos *primers*, impedindo a amplificação do gene. No entanto, estas amostras amplificaram o gene *nuc*, altamente específico para *S. aureus* (13), e apresentaram teste da coagulase positivo, sustentando a identificação como *S. aureus*.

A análise molecular revelou resultados aparentemente contraditórios nas amostras (corrimão e bar mesas). Ambas as amostras apresentaram genes de identificação de *S. aureus* (*nuc* e *femA*) e de resistência à meticilina (*mecA*), mas não metabolizaram manitol no meio *manitol salt agar*, característico do género. A amostra bar mesas não apresentou crescimento nos meios cromogénicos específicos de *S. aureus* ou MRSA. Esta discrepância nos resultados pode ser devida a uma limitação metodológica na abordagem molecular utilizada e que é importante realçar: os primers utilizados neste estudo foram inicialmente desenhados para reações de PCR em tempo real com recurso a sondas oligonucleotídicas fluorescentes (17). A utilização destas sondas confere uma especificidade acrescida ao método de deteção que, num sistema de PCR convencional, é perdida. Esta limitação explica também o resultado obtido para a estirpe *S. epidermidis* ATCC14990 no PCR para identificação de *S. aureus* (*nuc* e *femA* positivo).

Ainda assim, as confirmações adicionais efetuadas por meio de testes fenotípicos permitem-nos confiar nos resultados reportados neste trabalho.

Todas as superfícies analisadas apresentaram crescimento bacteriano no meio semi-seletivo, confirmando que funcionam como reservatórios microbianos. A identificação de MRSA em cadeiras do bar é particularmente relevante, considerando que estas superfícies de plástico podem manter a viabilidade de microrganismos até 175 dias (18). Esta persistência prolongada aumenta significativamente o risco de transmissão.

As mesas do bar representam superfícies de alto risco devido à sua utilização intensiva por toda a comunidade académica (professores, estudantes e funcionários), sendo utilizadas durante refeições e deixando frequentemente restos alimentares que favorecem a proliferação bacteriana. No entanto esta superfície não apresentou MRSA, possivelmente devido à elevada frequência da sua higienização (três vezes diariamente). Sugere-se estender esse protocolo de limpeza para as outras superfícies de alto contacto para evitar a proliferação e disseminação desta bactéria.

Os achados deste estudo evidenciam que a ESALD pode atuar como reservatório de MRSA, criando um ciclo de contaminação com implicações na saúde pública. Esta situação é particularmente preocupante considerando que funcionários, estudantes (futuros profissionais de saúde) e professores podem adquirir MRSA através do contacto com superfícies contaminadas na instituição.

O risco de disseminação é amplificado pelo facto de esta população frequentar regularmente ambientes clínicos (hospitais, clínicas, centros de saúde), podendo transportar este microrganismo multirresistente para contextos de cuidados de saúde e comunidade. Simultaneamente, esta contaminação pode ser perpetuada pela introdução contínua de novas estirpes de MRSA oriundas dos ambientes clínicos frequentados por esta população específica,

estabelecendo um ciclo de contaminação bidirecional entre a instituição académica e os serviços de saúde.

Conclusão

O presente estudo teve como objetivo principal a deteção de MRSA em superfícies de elevado contato na ESALD. Verificou-se que 10% das superfícies demonstraram contaminação por MRSA, nomeadamente em mesas de salas de aula e cadeiras do bar.

A prevalência de MRSA observada poderá estar intrinsecamente relacionada com o perfil singular da população da ESALD, onde estudantes e docentes da área da saúde estabelecem uma circulação entre ambientes hospitalares e académicos. Isto poderá facilitar a introdução de estirpes resistentes provenientes do meio hospitalar para o contexto académico.

Os resultados obtidos evidenciam a importância da implementação de medidas de controlo de infeção em instituições de ensino superior da área da saúde. É necessário estabelecer protocolos de limpeza e desinfeção direcionados as superfícies de elevado contacto e programas de sensibilização sobre higiene das mãos. A presença de MRSA nestas superfícies representa um risco não apenas para a comunidade académica, mas também para a comunidade em geral.

Este trabalho ressalta a importância da vigilância em instituições de ensino da área da saúde, fornecendo dados epidemiológicos essenciais para o desenvolvimento de estratégias preventivas direcionadas ao controlo da disseminação de MRSA entre o ambiente académico, hospitalar e comunitário.

Referências Bibliográficas

1. Jaradat ZW, Khwaileh M, Al W, Ababneh QO, Al A. Occurrence , distribution and pattern analysis of methicillin resistant (MRSA) and methicillin sensitive (MSSA) Staphylococcus aureus on fomites in public facilities. *Pathog Glob Health* [Internet]. 2021;115(6):377–91. Available from: <https://doi.org/10.1080/20477724.2021.1906563>
2. Roberts MC, Soge OO, No D. Comparison of multi-drug resistant environmental methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from recreational beaches and high touch surfaces in built environments. 2013;4(April):1–8.
3. Lin J, Lin D, Xu P, Zhang T, Ou Q, Bai C, et al. Non-hospital environment contamination with Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus: proportion meta-analysis and features of antibiotic resistance and molecular genetics. *Environ Res* [Internet]. 2016;150:528–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.06.040>
4. Thapaliya D, Taha M, Dalman MR, Kadariya J, Smith TC. Science of the Total Environment Environmental contamination with Staphylococcus aureus at a large , Midwestern university campus. *Sci Total Environ* [Internet]. 2017;599–600:1363–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.080>
5. Ababneh Q, Jaradat Z, Khanfar M, Alzu M, Sally M. Methicillin- - resistant Staphylococcus aureus contamination of high- - touched surfaces in a university campus. 2022;(January):4486–500.
6. Turner NA, Sharma-Kuinkel B, Maskarinec S, Eichenberger E, Shah P, Carugati M, et al. *Nat Rev Microbiol*. Nat Rev Microbiol. 2019;17(4):203–218.
7. Manageiro V, Paiva JA, Caniça M, Participantes EARS-Net-Portugal. Vigilância da resistência aos antibióticos em Portugal de 2015 a 2022. *Obs Epidemiológico* [Internet]. 2023;7:39–45. Available from: www.insa.pt
8. Almeida ST, Cristina Paulo A, Babo J, Borralho J, Figueiredo C, Goncalves B, et al. Absence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization among immunocompetent healthy adults: Insights from a longitudinal study. *PLoS One*. 2021;16(6 June).
9. Almeida ST, Nunes S, Paulo ACS, Faria NA, de Lencastre H, Sá-Leão R. Prevalence, risk factors, and epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus carried by adults over 60 years of age. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(3).
10. Almeida ST, Paulo AC, De Lencastre H, Sá-Leão R. Evaluation of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Carriage in the Elderly in Portugal Using Selective Enrichment Followed by Quantitative Real-Time PCR. *Microb Drug Resist*. 2022;28(5).
11. Wilkins CH, Alliance M, Alberti PM. Shifting Academic Health Centers From a Culture of Community Service to Community Engagement and Integration. 2020;94(6):763–7.

12. Böcher S, Middendorf B, Westh H, Mellmann A, Becker K, Skov R, et al. Semi-selective broth improves screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(4):717–20.
13. Saraiva MM, De Leon CM, Santos SC, Stipp DT, Souza MM, Santos Filho L, et al. Accuracy of PCR targeting different markers for *Staphylococcus aureus* identification: a comparative study using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry as the gold standard. *J Vet Diagnostic Investig.* 2018;30(2):252–5.
14. Nygaard TK, Pallister KB, Ruzevich P, Griffith S, Vuong C, Voyich JM. Saer binds a consensus sequence within virulence Gene promoters to advance USA300 pathogenesis. *J Infect Dis.* 2010;201(2).
15. Simões AS, Valente C, de Lencastre H, Sá-Leão R. Rapid identification of noncapsulated *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal samples allowing detection of co-colonization and reevaluation of prevalence. *Diagn Microbiol Infect Dis [Internet].* 2011 Nov 1 [cited 2025 Jun 6];71(3):208–16. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S073288931100304X>
16. Holmes MA. Prevalence and characterization of human mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in England. *J Antimicrob Chemother.* 2014;(November 2013):907–10.
17. Dewi YP, Nainggolan IM, Siregar JE, Antonjaya U. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. 2022;
18. Steinmann E. Persistence of Pathogens on Inanimate Surfaces: A Narrative Review. 2021;1–36.