



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE CIÊNCIAS NATURAIS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

RÔMULO ANDREY ARRUDA DA SILVA

**ANÁLISE DE CONTAMINAÇÕES MICRIBIOLÓGICAS EM LABORATÓRIOS DE
PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ**

**SANTARÉM
2023**

RÔMULO ANDREY ARRUDA DA SILVA

**ANÁLISE DE CONTAMINAÇÕES MICRIBIOLÓGICAS EM LABORATÓRIOS DE
PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Ciências Naturais como requisito final para obtenção do Grau de Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Oeste do Pará.
Orientador: Prof. Dr. Thalís Ferreira dos Santos

**SANTARÉM
2023**

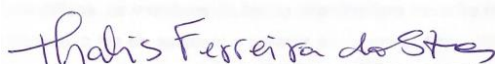
RÔMULO ANDREY ARRUDA DA SILVA

**ANÁLISE DE CONTAMINAÇÕES MICRIBIOLÓGICAS EM LABORATÓRIOS DE
PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ**

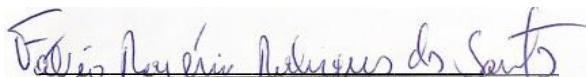
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Ciências Naturais como requisito final para obtenção do Grau de Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Oeste do Pará.

Conceito: **APROVADO**

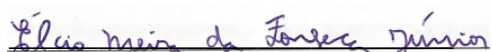
Data de Aprovação: 25/01/2023



Prof. Dr. Thalys Ferreira dos Santos – Orientador
Instituto de Biodiversidade e Florestas - IBEF



Prof. Dr. Fábio Rogério Rodrigues dos Santos
Instituto de Ciências da Educação – ICED



Prof. Dr. Elcio Meira da Fonseca Júnior
Instituto de Biodiversidade e Florestas - IBEF

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

S586a Silva, Rômulo Andrey Arruda da
Análise de contaminações microbiológicas em laboratórios de pesquisa da
Universidade Federal do Oeste do Pará./ Rômulo Andrey Arruda da Silva. –
Santarém, 2023.
55 p. : il.
Inclui bibliografias.

Orientador: Thalys Ferreira dos Santos.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do
Oeste do Pará, Instituto de Ciências da Educação, Programa de Ciências
Naturais, Licenciatura em Ciências Biológicas.

1. Microorganismo. 2. Contaminação bacteriana. 3. Limpeza. I. Santos, Thalys
Ferreira dos, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 628.536098115

Para minha amada família
Raimunda Adelina; Júlio César; Antônio
Wellington; Simey Aline; Kelves César.

AGRADECIMENTOS

Dedico primeiramente meu agradecimento ao meu orientador Prof. Dr. Thalís Ferreira dos Santos, pela oportunidade de me tornar seu orientando e ter me apresentado ainda mais de perto o a diversidade e peculiaridade da microbiologia, instigando o potencial que havia dentro de mim.

Ao Laboratório de Sanidade Animal - LARSANA e aos demais acadêmicos ali envolvidos, pelo conhecimento compartilhado, tanto em laboratório quanto durante a troca de ideias na execução de experimentos.

Ao Laboratório de Proteômica, Centro de Biotecnologia e Genética da Universidade Estadual de Santa Cruz - Ilhéus /Bahia, que em parceria com o professor Thalís Ferreira, contribuiu com as análises laboratoriais, objetivando a identificação dos microrganismos.

Agradeço grandemente aos meus queridos amigos e amigas que com suas palavras que me deram o impulso necessário para que eu me mantivesse firme até o fim. Sempre gosto de externar como sou grato em especial aos meus melhores amigos Mateus Duarte e Breno Tavares. Ao amigo Lucas Montiel e a amiga Aline Barroso, pelos conselhos e risadas que deixaram esse processo mais leve e divertido.

Aos meus amigos(as) de turma Dominique Ayka, Raí Ferreira, Pedro Teodósio, Ellen Fernanda obrigado por terem vivido e compartilhado sua trajetória nesses últimos cinco anos comigo.

À minha querida avó, Hermina Arruda, que infelizmente desencarnou durante a elaboração desta monografia. Era uma grande estimuladora para que eu concluísse o curso e já tinha muito orgulho do homem que sou e do que ainda serei.

À minha mãe, Raimunda Adelina, por ter passado comigo todos os momentos dessa trajetória acadêmica, sejam eles felizes ou turbulentos. Também professora, sempre me mostrou suas perspectivas da vida na docência, proporcionando lições valiosas. Obrigado por sempre estar ao meu lado.

À minha amada namorada, Irla Carol, pelo companheirismo, pela paciência e por sempre ter sido uma grande incentivadora não só para finalização deste trabalho, bem como todos e quaisquer projetos que eu planeje executar.

A todos aqueles que passaram pela minha vida, e que de alguma forma contribuíram para que hoje eu pudesse estar dando mais esse grande passo na minha caminhada pessoal e profissional.

“Vivemos em um mundo dentro de outros mundos, assim como as células, bactérias... Tudo dentro de uma VIDA.”

Carlos Freitas

RESUMO

O presente trabalho tem como propósito analisar a contaminação microbiana em laboratórios da Universidade Federal do Oeste do Pará. As coletas foram realizadas em 3 laboratórios da UFOPA. As coletas foram realizadas em bancadas, fluxo laminar e estufas. Para tanto, utilizaram-se swabs que eram friccionados numa área de 10cm² e inoculados nos meios TSA e Ágar MacConkey. Após incubação as colônias foram contadas e os diferentes morfotipos foram isolados e identificados por análise ao microscópio, PCR e sequenciamento. Após a identificação os microrganismos com potencial patogênico foram submetidos a um antibiograma. Ao fim das análises laboratoriais, foram encontrados um total de 920 microrganismos com 20 espécies diferentes entre bactérias e fungos identificadas. Três espécies se destacam por não serem encontradas em laboratórios de universidades com certa frequência, são elas: *Klebsiella pneumoniae*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* e *Acinetobacter baumannii*. Na presente análise, constatou-se que percentuais elevados das bactérias e fungos encontrados, estavam presentes em todos os laboratórios, que não atendiam os parâmetros recomendados pela OPAS, o que comprova que as condições higiênicas das bancadas, fluxos laminares e estufas, devem ser melhoradas para minimizar os riscos de infecções e contaminações em experimentos que sejam realizados. Concluiu-se com as análises que todos os ambientes laboratoriais apresentaram contaminação microbiana, ainda que tenha havido certa variação entre os ambientes. Faz-se necessária a padronização de protocolos de desinfecção e de boas práticas de laboratório como um todo.

Palavras-chave: Microrganismo. Contaminação Bacteriana. Limpeza. Laboratórios da UFOPA.

ABSTRACT

The present work aims to analyze the microbial contamination in laboratories of the Universidade Federal do Oeste do Pará. The collections were carried out in 3 UFOPA laboratories. The collections were carried out on benches, laminar flow ovens. For this purpose, swabs were used that were rubbed in an area of 10cm² and inoculated in TSA and MacConkey ágar. After incubation the colonies were counted and the different morphotypes were isolated and identified by microscopic analysis, PCR and sequencing. After identification microorganisms with pathogenic potential, they were submitted to an antibiogram. At the end of the laboratory analyses, a total of 920 microorganisms were found with 20 different species between bacteria and fungi identified. Three species stand out for not being found in university laboratories with a certain frequency, they are: *Klebsiella pneumoniae*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* and *Acinetobacter baumannii*. In the present analysis, it was found that high percentages of bacteria and fungi found were present in all laboratories, that did not meet the parameters recommended by the PAHO, which proves that the hygienic conditions of benches, laminar flows and ovens must be improved to minimize the risks of infections and contaminations in experiments that are carried out. It was concluded from the analyzes that all laboratory environments presented microbial contamination, although there was some variation between environments. It is necessary to standardize disinfection protocols and good laboratory practices as a whole.

Keywords: Microorganisms. Bacterial contamination. Cleaning. UFOPA laboratories.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Curva de crescimento microbiano. A) Curva com descrição das quatro fases; B) Fases de latência e de crescimento exponencial em números absolutos e logaritmo do número de células..... 15
- Figura 2** - Bancada LAB 1 com os locais da triplicata de coleta identificados com círculos brancos.....29
- Figura 3** - A imagem representa a área de contato de fricção do *swab* nas superfícies..... 30
- Figura 4** - A imagem representa a área de coleta em triplicata identificados com círculos brancos na Estufa – LAB 131
- Figura 5** - A imagem representa a área de coleta em triplicata identificados com círculos brancos no Fluxo Laminar – LAB 2.....31
- Figura 6** - Meios de cultura autoclavados, da direita para esquerda, Ágar MacConkey, Ágar TSA e Ágar TSB.....31
- Figura 7** – Diferença de quantidade de microrganismos encontrados nas bancadas, representados por uma placa de cada laboratório sendo LAB 1 (A), LAB 2 (B) e LAB 3 (C).....36
- Figura 8** – *Staphylococcus aureus* (Rosenbach, 1884) isolada com técnica de esgotamento em estrias.....37
- Figura 9** – *Klebsiella pneumoniae* (Trevisan, 1887) isolada no meio Macconkey.....43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Quantitativo percentual total todos os microrganismos encontrados nos três laboratórios.....	34
Gráfico 2 – Proporção de microrganismos isolados no LAB 1.....	34
Gráfico 3 – Proporção de microrganismos isolados no LAB 2.....	35
Gráfico 4 – Proporção de microrganismos isolados no LAB 3.....	35
Gráfico 5 – Quantitativo percentual total dos microrganismos identificados.....	36
Gráfico 6 – Número de espécies representativas encontradas no LAB 1.....	37
Gráfico 7 – Número de espécies representativas encontradas no LAB 2.....	38
Gráfico 8 – Número de espécies representativas encontradas no LAB 3.....	38

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	-	Termologia relacionada ao controle crescimento microbiano.....	16
-----------------	----------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais métodos físicos utilizados no controle de crescimento microbiano.....	18
Tabela 2 – Principais métodos químicos utilizados no controle de crescimento microbiano.....	20
Tabela 3 – Sugestão de métodos de limpeza e desinfecção em superfícies.....	27
Tabela 4 – Lista de espécies identificadas e os ambientes coletados divididos em bancada – BAN, Estufa – EST e Fluxo laminar – FLU.....	39
Tabela 5 – Teste de antibiograma realizado em algumas bactérias, onde R indica resistência e S indica sensibilidade.....	41

LISTA DE SIGLAS

BAN – Bancada

EST – Estufa microbiológica

FLU – Fluxo Laminar

ICTA – Instituto de Ciências e Tecnologias das Águas

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

LARSANA – Laboratório de Sanidade Animal

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

UFCs – Unidades formadoras de colônia

UFOPA - Universidade Federal do Oeste do Pará

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Crescimento Microbiano.....	14
1.2 Métodos de controle de crescimento físicos e químicos.....	16
1.3 Legislação quanto à limpeza.....	22
1.4 Regimento de limpeza dos laboratórios da UFOPA.....	24
1.5 Protocolos de limpeza.....	25
1.6 Identificação molecular de microrganismos.....	27
2 OBJETIVOS	28
2.1 Geral.....	29
2.2 Específicos.....	29
3 METODOLOGIA.....	29
3.1 Locais de coleta.....	29
3.2 Coleta e isolamento de microrganismos.....	29
3.3.1 Identificação dos isolados.....	32
3.3.2 Teste de sensibilidade aos antibióticos.....	33
4 RESULTADOS.....	33
5 DISCUSSÃO.....	42
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
REFERÊNCIAS.....	

1 INTRODUÇÃO

Os fungos e as bactérias podem ser encontrados em todos os lugares: no ar, no solo, nas roupas, nos cabelos, na água etc. Em consequência, a atividade laboratorial, na maioria dos casos exige técnicas adequadas de esterilização. A contaminação consome tempo e dinheiro, além de alterar os resultados (FERNANDEZ, 1993). As contaminações podem ser provenientes de várias fontes, como citadas anteriormente. Por essas vias, esporos e células de microrganismos penetram nos locais de trabalho pelos condicionadores de ar, podendo ser também transportadas e introduzidas pelo homem, permanecendo no ambiente em condições de assepsia inadequada (OLIVEIRA, 2007).

Outros equipamentos que podem introduzir uma contaminação são aqueles destinados aos tratamentos de água (deionizadores, destiladores etc.), seja pela falta de manutenção ou por manuseio inadequado (CAPÓ, 2000). Tendo como base os parâmetros da OPAS de 10^2 UFC/superfície total como sendo representativo de uma alta contaminação por bactérias, em seus estudos, Capó (2000) verificou que as câmaras de fluxo laminar são os principais locais onde a maioria dos contaminantes pode ser introduzida por manipulação.

Outras contaminações são introduzidas em culturas de tecidos como práticas de laboratório deficientes, com é o caso da *Bacillus sp.* que pode contaminar os meios de cultura devido à esterilização insuficiente ou inadequado funcionamento de autoclaves, fato aferido por Montarroyos, 2000 apud (OLIVEIRA, 2007).

Muitos outros fatores corroboram para uma limpeza ineficaz dos ambientes laboratoriais. Em laboratórios de pesquisa médica por exemplo, não só a limpeza tem influência nas contaminações recorrentes. Segundo Rodrigues, 2016, estudos relacionados a acidentes de trabalho na área da saúde têm sido desenvolvidos desde a década de 70, em consequência principalmente de falta de EPIs, cansaço por excesso de trabalho, mau uso de equipamentos e até mesmo armazenamento inadequado de materiais. Nesse contexto, pode haver a exposição das pessoas que neles trabalham, estudam e transitam pelos diferentes riscos, sejam eles: biológicos, químicos, físicos, ergonômicos e de acidentes; também gerando agravos para os animais e para meio ambiente. Atualmente mais de 90% de acidentes em laboratório decorrentes de contaminações biológicas, ocorrem devido à deficiência das informações sobre as fontes de perigo, assim como a negligência no respeito às

normas de biossegurança. É fundamental que o estudante manipulador de microrganismos conheça os regulamentos de biossegurança em vigor nas aulas práticas (RODRIGUES, 2016).

A biossegurança pode ser definida como o conjunto de ações voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, visando à saúde do homem, dos animais, à preservação do meio ambiente e à qualidade dos resultados (SANGIONI *et al.*, 2013) apud (TEIXEIRA & VALLE, 2010). Nesse sentido, os acadêmicos têm sido apontados como o grupo para o qual a educação em biossegurança e o controle de infecção cruzada são imprescindíveis para correto treinamento e cumprimento dos protocolos rotineiramente (PINELLI *et al.*, 2011).

Técnicas e práticas de laboratório: nos laboratórios, os indivíduos necessitam receber treinamento em relação às técnicas de biossegurança. Cada unidade deve desenvolver seu próprio manual de biossegurança, identificando os riscos e os procedimentos operacionais de trabalho, o qual deverá ficar à disposição de todos os usuários do local (PENNA *et al.*, 2010).

Na percepção de Sangioni *et al.* 2013, laboratórios de ensino de microbiologia e parasitologia nas universidades brasileiras são ambientes onde geralmente se realizam atividades de ensino, pesquisa e extensão de forma isolada ou em conjunto. Ademais, no mesmo espaço, convivem pessoas, equipamentos, reagentes, soluções, agentes e amostras biológicas e os resíduos gerados nessas atividades.

Quando se trata da estrutura física e elaboração, os laboratórios de ensino de microbiologia e parasitologia apresentam características diferenciadas (barreiras secundárias), devido à grande variabilidade de atividades realizadas em cada unidade. As barreiras secundárias incluem tanto o projeto como a construção das instalações e da infraestrutura do laboratório (NICOLAU, 2014). A estrutura física laboratorial deve ser elaborada e/ou adaptada mediante a participação conjunta de especialistas, incluindo: os pesquisadores, técnicos do laboratório, arquitetos e engenheiros, de modo a estabelecer padrões e normas a fim de garantir as condições específicas de segurança de cada laboratório (PENNA *et al.*, 2010)

Partindo deste pressuposto e levando em conta que é fundamental boas práticas de higienização, bem como o conhecimento da biossegurança a fim de preservar e/ ou minimizar os riscos nas atividades desenvolvidas, o presente trabalho

tem como propósito a busca e análise de contaminações microbianas em laboratórios da Universidade Federal do Oeste do Pará.

1.1 Crescimento Microbiano

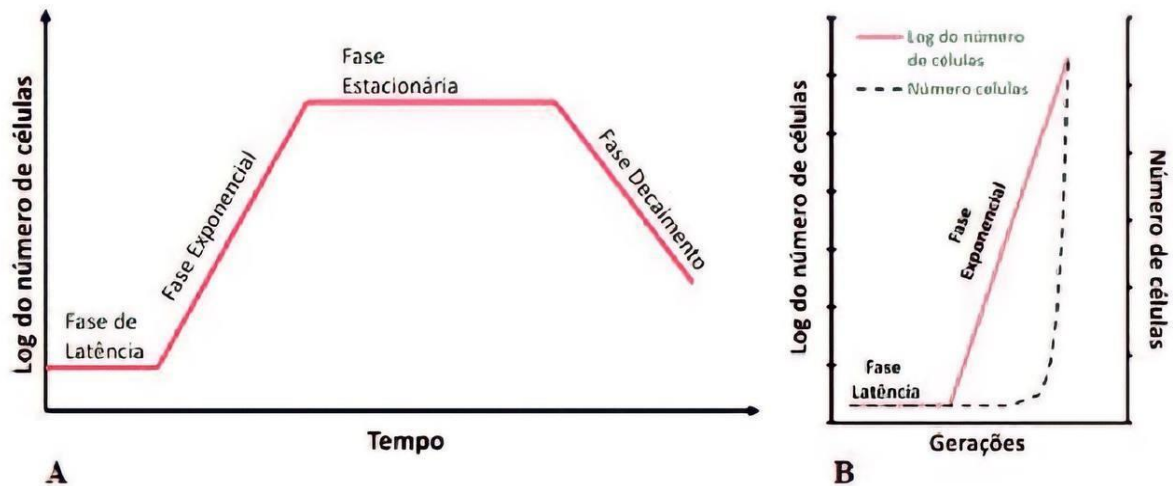
Crescimento de uma população é definido como o aumento do número de células dessa população. A taxa de crescimento da população microbiana corresponde à variação (aumento) do número de células por unidade de tempo (NICOLAU, 2014).

Existem diversos processos de quantificar (ou enumerar) o número de células de uma população microbiana, entre os quais se destacam (I) a contagem de número de células ao microscópio, (II) a contagem de colónias (i.e. células viáveis) que se formam após espalhamento de uma alíquota de uma cultura de microrganismos (suspensão de células em meio líquido) numa superfície de meio sólido, e (III) a quantificação da biomassa celular através da quantificação de componentes químicos celulares, partindo do princípio que a duplicação do número de células resulta na duplicação de todos os seus componentes químicos (NICOLAU, 2014).

Subintende-se que o crescimento de uma população microbiana e a taxa de crescimento que esta apresenta são influenciados pela genética microbiana (que “dita” as características fisiológicas e metabólicas de cada microrganismo) e pelas condições ambientais (físicas e químicas, incluindo os nutrientes). Quando em condições ambientais ótimas, o crescimento não é limitado e a taxa de crescimento será máxima. Contudo, em condições naturais, o crescimento de uma população microbiana apresenta limitações diversas mais ou menos restritas no tempo (ex. pH, temperatura, e nutrientes como oxigénio), o que resulta em taxas de crescimento inferiores à taxa de crescimento máxima (MADIGAN *et al.*, 2015).

O crescimento microbiano é, no entanto, geralmente limitado por uma diversidade de condicionantes que resultam em ciclos de crescimento como o ilustrado na Figura 1. Nesta curva de crescimento identificam-se 4 fases de crescimento: fase lag (de latência ou de arranque), fase exponencial, fase estacionária, fase de declínio (ou de morte) (NICOLAU, 2014).

Figura 1 – Curva de crescimento microbiano. A) Curva com descrição das quatro fases; B) Fases de latência e de crescimento exponencial em números absolutos e logaritmo do número de células.



Fonte consultada disponível em: [https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Curva-decrescimento-microbiano-adaptado-de-Madigan-et-al-\(2012\)](https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Curva-decrescimento-microbiano-adaptado-de-Madigan-et-al-(2012))

A fase de latência ou lag corresponde à fase inicial de crescimento na qual as células adaptam o seu metabolismo ao novo meio de cultura, sintetizando macromoléculas tais como os componentes dos ribossomos necessários para síntese de proteínas e enzimas necessárias durante a divisão celular, aumento de volume e iniciando a divisão celular (MOURA, 2018). A duração desta fase varia com a condição em que se encontra o microrganismo e com a natureza do meio. A fase exponencial corresponde à fase em que as bactérias se dividem a uma taxa máxima, constante, sendo o tempo de geração também constante. A velocidade de divisão de uma dada bactéria depende das condições ótimas para cada organismo, tais como fatores nutricionais, pH, temperatura e composição do meio (TORTORA GJ, FUNKE BR, 2012).

Na fase estacionária o crescimento populacional exponencial cessa e o número de células resultantes da multiplicação iguala ao número de células que morre, normalmente devido à falta de um composto ou elemento necessário ao seu metabolismo. Esta fase é geralmente atingida quando a população bacteriana se aproxima de 10^9 células por mL. Os protozoários atingem concentrações máximas de 10^6 células por mL. Por fim, a fase de morte ou de declínio o número total de células viáveis decresce e aumenta o número de células que morre, terminando por ocorrer lise celular (MOURA, 2018).

1.2 Métodos de controle de crescimento físicos e químicos

Quando se estuda o crescimento microbiano, temos por outro lado, mecanismos que podem fazer seu devido controle, logo, pode ser executado por métodos físicos, químicos, mecânicos ou biológicos. O controle microbiano com esses agentes visa prevenir a transmissão e surgimento de novas doenças, a contaminação de ambientes e pôr fim a deterioração de alimentos ou outras substâncias (DUARTE, 2011). A Tabela 1, demonstra alguns termos usados para distinguir mecanismos de controle e suas funções.

Quadro 1: Terminologia relacionada ao controle de crescimento microbiano.

TERMO	APLICAÇÃO
Limpeza	Remoção de materiais indesejáveis, geralmente com detergente e sob ação mecânica.
Desinfecção	Destruição de microrganismos por processos físicos ou químicos, sem necessariamente destruir os esporos.
Esterilização	Complementa a desinfecção por destruição dos esporos, por processos físicos ou químicos.
Descontaminação	Processo final de remoção de qualquer organismo patogênico, tomando o material seguro à manipulação.
Antissepsia	É feita através de agentes antimicrobianos em tecidos para eliminação de microrganismos.
Assepsia	Trata-se da desinfecção química da pele, mucosas e tecidos vivos.

Fonte consultada: Adaptado de Pereira *et al.* (2011)

Do ponto de vista microbiológico, os micro-organismos são considerados mortos quando perdem, de forma irreversível, seu potencial metabólico, bem como sua capacidade de se multiplicar. Fazendo uma subdivisão dos métodos citados acima, métodos físicos podem ser eficientes, com baixo custo e com poucos efeitos indesejáveis (RUI *et al.*, 2011). Os principais métodos físicos para controle de micro-organismos são:

Calor, que durante o processo de esterilização são utilizados o calor úmido ou o calor seco. O primeiro elimina os micro-organismos por meio da desnaturação proteica enquanto no segundo a eliminação ocorre devido a oxidação. O controle por calor úmido pode ser feito por fervura, autoclave e pasteurização. Já O calor seco requer temperaturas e tempos de exposição mais elevados do que o calor úmido. O processo de esterilização tem como objetivo destruir todos os micro-organismos, células vegetativas e esporos. Pode ser feito por chama direta, incineração ou esterilização com calor quente (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Filtração, que segundo Tortora *et al.* (2017), consiste na passagem de um líquido ou gás através de um material semelhante a uma tela, com poros pequenos o suficiente para reter microrganismos. Desse modo, um vácuo é criado no frasco coletor, e a pressão do ar força a passagem do líquido pelo filtro. A filtração é usada para esterilizar os materiais sensíveis ao calor, como alguns meios de cultura, enzimas, vacinas e soluções antibióticas (DAMASO *et al.*, 2016).

O frio apresenta utilidade no controle microbiano nas temperaturas dos refrigeradores comuns (0 a 7°C), a taxa metabólica da maioria dos microrganismos é tão reduzida que eles não podem se reproduzir ou sintetizar toxinas. Em outras palavras, a refrigeração comum tem efeito bacteriostático (GOMES *et al.*, 2007). Pode-se aplicar esse método por refrigeração, ultracongelamento ou liofilização.

A alta pressão funciona em suspensões líquidas e transfere - se instantânea e uniformemente para a amostra. A pressão alta o suficiente altera as estruturas moleculares das proteínas e dos carboidratos, resultando na rápida inativação das células bacterianas vegetativas. É muito usado na indústria alimentícia por aumentar o tempo de vida em prateleira de alimentos perecíveis (DA ROSA, 2020).

A dessecação, é uma condição conhecida ocasionada pela ausência de água. Nela os microrganismos não podem crescer ou se reproduzir, contudo, permanecem viáveis por anos. Então, quando a água é oferecida a eles, podem retomar seu crescimento e divisão. Geralmente esse método é usado em laboratório para a conservação de microrganismos (TORTORA GJ, FUNKE BR, 2012).

Pressão osmótica, no conceito de Pereira *et al.* (2011), consiste nas altas concentrações de sais ou açúcares provocam a saída de água do interior da célula, o que dificulta o crescimento microbiano. Nota-se, por exemplo, que a adição de solutos,

sal ou açúcar, em alimentos é uma forma racional de conservá-los, sendo em muitos casos dispensável o uso da refrigeração.

Por último, mas não menos importante, a radiação é outro método que apresenta vários efeitos sobre as células, dependendo de seu comprimento de onda, intensidade e duração. Existem dois tipos de radiação que destroem microrganismos (radiação esterilizante): ionizante e não ionizante (MENEZES *et al.*, 2016).

Tabela 1: Principais métodos físicos utilizados no controle de crescimento microbiano.

Agente Físico	Mecanismo de ação	Uso preferencial	Comentário
Calor	Desnaturação de proteínas	de Pratos, bacias, equipamentos e utensílios variados	Seus diferentes tipos e podem destruir células bacterianas, fúngicas.
Filtração	Separação das células do líquido suspensão	Esterilização de líquidos e vacinas. (p. ex. enzimas, vacinas)	Remove microrganismos através da passagem de um líquido ou gás através de um material semelhante a uma tela.
Frio	Destruição das reações químicas e possíveis alterações nas proteínas.	Conservação de alimentos, fármacos e culturas.	Possui efeitos bacteriostático e é muito eficaz para conservação.
Alta Pressão	Alteração da estrutura molecular	Sucos de fruta	Conservação de cores, sabores e valores nutricionais.
Dessecação	Interrupção do metabolismo	Conservação de alimentos	Envolve a remoção de água dos organismos.
Pressão Osmótica	Plasmólise	Conservação de alimentos	Resulta na perda de água das células microbianas.
Radiação	Destruição ou danos ao DNA	Esterilização de produtos farmacêuticos	Não disseminado na esterilização de rotina e

e ambientes fechados radiação não muito penetrante.
(germicida).

Fonte consultada: Adaptado de Tortora *et al.* (2017)

Os métodos de controle químicos são considerados esterilizantes, quando possuem a capacidade de matar todos os indivíduos microbiológicos, tal como os métodos físicos, conseguem fazer o devido controle de uma variedade de microrganismos e seu efeito varia de acordo com sua composição. Eles podem ser:

Fenóis ou compostos fenólicos, contêm uma molécula de fenol que é quimicamente alterada para reduzir suas propriedades irritantes ou aumentar sua atividade antibacteriana em combinação com um sabão ou detergente. Os compostos fenólicos exercem atividade antimicrobiana causando lesão nas membranas plasmáticas lipídicas, o que resulta em vazamento do conteúdo celular (HENRIQUE; FILHO, 2016).

Aldeídos, de acordo com Pereira *et al.* (2011) é um desinfetante de alto nível e mais utilizado para tratamento de materiais termosensíveis. A ação germicida está relacionada à alteração do RNA, do DNA e da síntese proteica. O efeito contra *Mycobacterium spp.* requer no mínimo 20 minutos em concentração não inferior a 2%. Quando usado em uma solução a 2% (Cidex), é bactericida, tuberculicida e virucida em 10 minutos, e esporocida em 3 a 10 horas (TORTORA, GERALD J.; FUNKE, 2017).

O cloro, é um método muito eficiente e está presente em quase 100% da água tratada (água encanada) no Brasil, permitindo que milhares de brasileiros estejam protegidos contra doenças que são transmitidas por água contaminada. O cloro, na forma de hipoclorito de sódio (água sanitária), é uma das formas mais eficientes para a prevenção de contaminação com agentes microbianos de veiculação hídrica e agem inibindo as funções vitais da célula (MIRANDA *et al.*, 2014).

Os Peróxigênios e outras formas de oxigênio desinfetantes de alto nível, principalmente quando se trata de materiais termosensíveis. Sua ação germicida está relacionada ao fato desse agente ser oxidante. Isso implica em desnaturação proteica, ruptura da permeabilidade da membrana celular. A inativação de micro-organismos é dependente da temperatura, tempo e concentração (LACERDA, 2013).

Os agentes de superfície, ou surfactantes, podem reduzir a tensão superficial entre as moléculas de um líquido. Esses agentes incluem os sabões e os detergentes, que tem função importante na remoção mecânica dos microrganismos pela

esfregação. O sabão por exemplo, rompe o filme oleoso em gotículas pequenas, um processo denominado emulsificação, e água e sabão, juntos, removem o óleo emulsificado e os resíduos, fazendo-os flutuar para longe à medida que a pele é lavada (SALUD, 2016). Podem ser ainda sanitizantes ácido-aniônicos e compostos quaternários de amônio (detergentes catiônicos).

O álcool: etílico e o álcool isopropílico são os mais utilizados como antissépticos. Apresentam ação rápida e amplo espectro de efeito microbicida em formas vegetativas de bactérias, vírus e fungos, porém, não são esporicidas. Conseguem desestruturar a membrana plasmática, desnaturar proteínas celulares, comprometer o metabolismo microbiano e promover a lise das células. O álcool etílico a 70 % é mais efetivo pois a água corrobora a absorção desse agente para o interior da célula (LIMA, 2015).

Metais pesados podem ser biocidas ou antissépticos, incluindo a prata, o mercúrio e o cobre. Agem quando os íons metálicos se combinam com os grupos sulfidril na proteínas celulares, ocorre desnaturação (TORTORA, GERALD J.;FUNKE, 2017).

Na Tabela 2, é nota-se de forma resumida os métodos citados acima e seu mecanismo de ação antimicrobiano.

Tabela 2: Principais métodos químicos utilizados no controle de crescimento microbiano.

Agente Químico	Mecanismo de ação	Uso preferencial	Comentário
Fenóis	Ruptura da membrana plasmática e desnaturação de proteínas.	Superfícies ambientais, instrumentos, de superfícies cutâneas e membranas mucosas.	Alguns usados raramente como desinfetante. Outros são reativos, mas eficazes contra gram-positivas.
Aldeídos	Desnaturação de proteínas.	O glutaraldeído (Cidex) é menos irritante que o formaldeído e é usado para a desinfecção de equipamentos médicos.	Antimicrobianos muito efetivos.

(continua)

Tabela 3: (Continuação)

Agente Químico	Mecanismo de ação	Uso preferencial	Comentário
Peróxigênios	Oxidação.	Superfícies contaminadas; alguns ferimentos profundos, em que eles são muito efetivos contra os anaeróbios sensíveis ao oxigênio	O ozônio é amplamente usado como suplemento para a cloração; o peróxido de hidrogênio é um antisséptico fraco, mas um bom desinfetante
Agentes de superfície	Inibição enzimática, desnaturação das proteínas, ruptura das membranas plasmáticas.	Antisséptico para a pele, instrumentos, utensílios, objetos de borracha.	Contêm antimicrobianos e amplo espectro de atividade; atóxicos, não corrosivos, e de ação rápida.
Cloro	Inibem funções vitais da célula.	Principalmente para esterilização de objetos que seriam danificados pelo calor.	Hipoclorito de sódio e água sanitária são comumente utilizados.
Álcoois	Desnaturação das proteínas e dissolução dos lipídeos.	Termômetros e outros instrumentos. Quando a pele é limpa com álcool tem grande ação antisséptica.	Bactericida e fungicida, mas ineficaz contra endósporos ou vírus não envelopados; álcoois comumente utilizados são o etanol e o isopropanol.
Metais Pesados	Desnaturação das enzimas e de outras proteínas essenciais.	Utilizado na prevenção da oftalmia neonatal ou creme tópico em queimaduras.	Os metais pesados, como a prata e o mercúrio, são biocidas.

Fonte consultada: Adaptado de Tortora *et al.* (2017)

1.3 Legislação quanto à limpeza

São poucas as leis e normas que definem parâmetros para limpeza de laboratórios de universidades atualmente. Boa parte delas, é voltada para laboratórios de análises clínicas e hospitalares. Dessa maneira, resta às unidades de pesquisa acadêmicas, seguirem parâmetros mais restritos e individuais para as demandas que atendem.

Uma dessas normas, se consolidou após a pandemia da Covid-19, que trouxe muitas mudanças no sentido de mais cautela com higienização das mãos, o Ministério da Saúde trouxe à vigor a Resolução-RDC nº42, de 25 de outubro de 2010, o Art. 1º define a obrigatoriedade de disponibilização de álcool para fricção antisséptica das mãos pelos serviços de saúde do país e destaca as diferenças de higienização das mãos e fricção antisséptica mencionadas nos incisos III, IV, V, VI.

Art. 1º Fica aprovada a obrigatoriedade de disponibilização de preparação alcoólica para fricção antisséptica das mãos, pelos serviços de saúde do país, nos termos desta Resolução.

III- Fricção antisséptica das mãos com preparação alcoólica: aplicação de preparação alcoólica nas mãos para reduzir a carga de microrganismos sem a necessidade de enxague em água ou secagem com papel toalha ou outros equipamentos.

IV - Higienização das mãos: termo genérico aplicável à higienização simples das mãos, higienização antisséptica das mãos, fricção antisséptica das mãos com preparação alcoólica e antisepsia cirúrgica das mãos ou preparo pré-operatório de mãos.

V - Higienização simples das mãos: ato de higienizar as mãos com água e sabonete comum, sob a forma líquida.

VI - Higienização antisséptica das mãos: ato de higienizar as mãos com água e sabonete associado a agente antisséptico.

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 1994), devem ser considerados para a aquisição de produtos saneantes os seguintes itens:

- De acordo com a natureza da superfície a ser limpa ou desinfetada e o seu comportamento perante o produto.

- Quanto sua possibilidade de corrosão da superfície a ser limpa. Tipo e grau de sujidade e a sua forma de eliminação.
- Tipo e contaminação e a sua forma de eliminação (microrganismos envolvidos com ou sem matéria orgânica presente).
- Recursos disponíveis e métodos de limpeza adotados.
- O grau de toxicidade do produto.
- Os métodos de limpeza e desinfecção, tipos de máquinas e acessórios existentes.
- A concentração de uso preconizado pelo fabricante.
- Segurança na manipulação e uso dos produtos.
- Princípio ou componentes ativos.
- Prazo e tempo de contato para a ação.
- Concentração necessária para a ação.
- Possibilidade de inativação perante matéria orgânica.
- Estabilidade frente às alterações de luz, umidade, temperatura de armazenamento e matéria orgânica.
- Temperatura de uso.
- pH.
- Incompatibilidade com agentes que podem afetar a eficácia ou a estabilidade do produto como: dureza da água, sabões, detergentes ou outros produtos saneantes.
- Prazo de validade para uso do produto.

Não obstante, deve ser exigido do fornecedor a comprovação de que o produto seja notificado ou registrado na Anvisa com as características básicas de aprovação e no caso de produtos com ação antimicrobiana, laudo de testes no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) ou demais laboratórios acreditados para essa análise, e finalmente, o laudo técnico do produto (ANVISA, 2021).

A Lei nº. 6.360, de 23 de setembro de 1976 (BRASIL, 1976) dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos. Só poderão produzir, fabricar, importar e distribuir produtos saneantes as empresas com autorização de funcionamento concedida pela Anvisa e cujos estabelecimentos tenham sido licenciados pelo órgão sanitário das Unidades Federadas em que se localizam. De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC da Anvisa nº.

184, de 22 de outubro de 2001 (BRASIL, 2001), entende-se por produtos saneantes e afins mencionados no art. 1º da Lei nº. 6.360, de 23 de setembro de 1976 (BRASIL, 1976), as substâncias ou preparações destinadas a limpeza, desinfecção, desinfestação, desodorização/odorização de ambientes domiciliar, coletivos e/ou públicos, para utilização por qualquer pessoa, para fins domésticos, para aplicação ou manipulação por pessoas ou entidades especializadas, para fins profissionais.

O registro e a notificação dos produtos saneantes têm validade por cinco anos podendo ser renovado. Todos os produtos saneantes deverão ser formulados com substâncias que não apresentem efeitos comprovadamente mutagênicos, teratogênicos ou carcinogênicos em mamíferos e devem atender às legislações específicas (EVANGELISTA, 2019).

Anvisa (2017) cita as legislações RDC 40, de 05 de junho de 2008 (BRASIL, 2008), e a RDC nº. 14, de 28 de fevereiro de 2007 (BRASIL, 2007), ambas harmonizadas no Mercosul, tratam da notificação e do registro de produtos saneantes respectivamente. A primeira resolução aprova o regulamento técnico para produtos de limpeza e afins e a segunda, os produtos com ação antimicrobiana. Em relação ao registro, os desinfetantes para artigos semicríticos e os esterilizantes continuam seguindo as orientações contidas na Portaria 15, de 23 de agosto de 1988 (BRASIL, 1988), ou suas atualizações como a Resolução GMC no 19/10, do Mercosul, que se encontra em fase de internalização na Agência de Vigilância Sanitária.

Essas normativas vieram para somar em termos de biossegurança, pois exigidas em laboratório, o risco de contaminações já reduz em nível significativo. Contudo, no site da ANVISA na aba de legislação, não é possível encontrar nenhuma lei, resolução, ou normativa quando se trata de limpeza e higienização de laboratórios.

1.4 Regimento de limpeza dos laboratórios da UFOPA

Atualmente, a UFOPA abrange 23 laboratórios de pesquisa, estando estes distribuídos em 7 blocos nas dependências das unidades do Campus Tapajós.

Desses 23 laboratórios, 11 trabalham com manipulação direta e/ou indireta de microrganismos. Em 5 diferentes blocos, apenas 5 laboratórios, dos 11 citados, possuem normas internas disponíveis para consulta no banco de dados da Ufopa. As normas, dizem respeito aos protocolos de execução de atividades e estão descritas e bem definidas as questões que determinam os requisitos básicos para a proteção da

vida e da propriedade nas dependências dos labs., onde são manuseados, além do material microbiológico, produtos químicos e equipamentos que podem causar alergias e risco à integridade física dos usuários. Tal como procedimentos de biossegurança sugeridos pela ANVISA ou MS, devem obrigatoriamente serem obedecidos.

Existem algumas exigências padrões nessas normas, como obrigatoriedade do uso de EPI (Equipamento de Proteção Individual) próprio: avental (jaleco) de mangas longas e devidamente fechado e com trajas apropriados sempre que forem manipuladas substâncias, reagentes e amostras. Outros EPIs como luvas, óculos de proteção, máscara e outros, eventualmente necessários, também devem ser utilizados conforme a necessidade dos mesmos. Lavagem e higienização das mãos (ainda que se tenha usado luvas. Limpeza o uso da bancada, que seja adequada a ela, evitando quaisquer problemas inerentes à bancada.

Quanto ao descarte de material com risco biológico, todos os resíduos químicos gerados neste laboratório deverão ser devidamente identificados preenchendo-se etiquetas padronizadas. Os materiais de descarte biológico com risco de contaminação devem ser eliminados por autoclavagem prévia. Já o material quando sem elevada contaminação, é recomendada a lavagem com sabão em pó ou solução detergente e esponja, e em seguida enxaguados com porções pequenas de água destilada. Logo após, são depositados para escorrer e colocados em estufa com uma temperatura controlada em torno de 70°C para secagem.

Entrando em contato com a DSQV da UFOPA, foi repassada a informação de que a limpeza dos laboratórios é de responsabilidade das empresas terceirizadas, todavia, fazem a limpeza somente do chão e recolhimento dos resíduos sólidos para descarte.

Desde o fim do ano de 2022 até os dias atuais, um estatuto para todos os laboratórios está sendo produzido por uma Comissão especializada, e tem por objetivo criar e protocolos padronizados. Espera-se que este estatuto possa entrar em vigor ainda no primeiro semestre desse ano.

1.5 Protocolos de limpeza

Não havendo normativas de âmbito nacional, é vital que cada instituição em parceria com as empresas terceirizadas, desenvolvam protocolos específicos de

limpeza. Os protocolos têm a finalidade de preparar o ambiente para suas atividades, mantendo a ordem e conservando equipamentos e instalações, evitando principalmente a disseminação de microrganismos responsáveis pelas infecções relacionadas à assistência à saúde (ANVISA, 2017).

Torres & Lisboa (2007) elencam que ao limpar superfícies de serviços de saúde ou laboratório (que se adequam nesse contexto), pretende-se proporcionar aos usuários um ambiente com menor carga de contaminação possível, contribuindo na redução da possibilidade de transmissão de patógenos oriundos de fontes inanimadas, por meio das boas práticas de limpeza e desinfecção de superfícies.

Vale lembrar que os jalecos de laboratório só devem ser usados nas áreas designadas. Fora do ambiente lhe indicado, podem carregar diversos microrganismos contaminantes. Logo, quando não estiverem em uso, devem ser armazenados de forma adequada; não devem ser pendurados em cima de outros jalecos de laboratório, ou em armários ou cabides com itens pessoais. Os jalecos de laboratório não devem ser levados para casa pela equipe (OPAS, 2021).

Brasil (2000) sugere que resíduos microbiológicos de amostras clínicas e todos os materiais empregados no laboratório de microbiologia (meios de cultura inoculados, meios de transporte, espécimes clínicos, swabs empregados na coleta etc.) devem ser previamente autoclavados antes de serem descartados como resíduo sólido.

Já os resíduos químicos que sejam tóxicos, devem ser armazenados no local onde são gerados, em ambiente específico e arejado, acondicionado em saco plástico branco, dentro de suas próprias embalagens primárias. Para o caso da inexistência de suas embalagens, devem-se utilizar frascos de até dois litros, resistentes, com tampa rosqueada, vedante e identificado com o nome e fórmula do produto químico, símbolo e expressão de resíduo químico tóxico. Dependendo do volume gerado e o tempo de acondicionamento para o tratamento ou disposição final, o laboratório deve também possuir local específico para o abrigo de resíduos, fora da unidade geradora e fora da edificação do estabelecimento (BRASIL, 2000). Na tabela 3, temos um gráfico resumido de quais locais e métodos de limpeza são eficazes para superfícies.

Tabela 3: Sugestão de métodos de limpeza e desinfecção em superfícies.

EQUIPAMENTO	TÉCNICA	ATUAÇÃO
Paredes	Limpeza Desinfecção	e/ou Realizar a limpeza com água e sabão ou detergente. Utilizar movimento unidirecional (de cima para baixo).
Lixeiras	Limpeza Desinfecção	e/ou Realizar a limpeza com água e sabão ou detergente.
Bancadas e prateleiras	Limpeza Desinfecção	e/ou Realizar a limpeza com água e sabão ou detergente. Enxaguar e secar. Friccionar com álcool a 70% ou utilizar outro desinfetante definido pelo SCIH.
Geladeiras	Limpeza	Realizar a limpeza das partes interna e externa com água e sabão ou detergente. Secar bem com pano limpo
Lavatórios/pias	Limpeza	Lavar com água e sabão ou detergente. Enxaguar e secar
Bebedouros	Limpeza Desinfecção	e/ou Realizar a limpeza com água e sabão ou detergente. Enxaguar e secar. Friccionar com álcool a 70% ou utilizar outro desinfetante definido pelo SCIH.

Fonte consultada: Adaptado de ANVISA (2017)

1.6 Identificação molecular de microrganismos

Pagani *et al.* (2012) elenca que o crescimento de estudos genômicos dos microrganismos foram impulsionados para se ter uma melhor compreensão da biologia e da evolução das suas relações, assim como a identificação de genes de virulência e alvos para novos mecanismos terapêuticos, como os fármacos

antimicrobianos. Pelo que se tem conhecimento, existem cerca de 1715 genomas completamente sequenciados de bactérias, mais de 90 projetos genomas de Archea e 5140 de Bacteria em alguma fase de finalização (PAGANI *et al.*, 2012).

É importante destacar que a análise desses dados somente foi possível devido o melhoramento dos programas e algoritmos desenvolvidos para a recuperação dessas informações, essas por sua vez, estão disponíveis em grandes bancos de dados biológicos (SARMENTO, 2013).

Para se ter acesso a essas informações genômicas a partir do sequenciamento do genoma dos microrganismos, as sequências de DNA são então comparadas com sequências previamente obtidas, disponíveis em banco de dados públicos (curados ou não curados) usando sistemas de recuperação de sequências (SARMENTO, 2013).

Uma das principais técnicas de diagnóstico de agentes responsáveis por infecções hospitalares consiste na amplificação através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), seguido do sequenciamento e análise da região conservada codificadora de RNA ribossomal 16S, que por conseguinte proporciona uma identificação rápida e independente de conhecimento prévio da espécie de microrganismo em estudo. Esse método comparado com outras técnicas moleculares, requer menores riscos no processo de análise e interpretação dos resultados, reduzindo as possibilidades de falso negativo ou positivo (ANDREI; ZERVOS, 2006).

A análise da sequência do gene do rRNA 16S conduz ao estabelecimento de padrões de transmissão epidemiológica de bactérias patogênicas no ambiente hospitalar ou laboratorial. Esse método é utilizado ainda em identificações de meios de cultura de difícil identificação, permitindo a análise direta de amostras biológicas e a independência com relação aos meios de crescimento (CLARRIDGE, 2004). O rRNA 16S também possui utilidade na identificação filogenética de bactérias. Logo, as análises das sequências do rRNA 16S têm se tornado um método padrão para estudos filogenéticos de microrganismos (SARMENTO, 2013) *apud* (PATEL *et al.*, 2000).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Analisar a contaminação microbiana nos laboratórios da UFOPA.

2.2 Específicos

- Coletar, isolar e identificar microrganismos presentes nos locais estudados durante os dias de experimento.
- Relacionar a presença de microrganismos e seu potencial de contaminação em experimentos de pesquisas.

3 METODOLOGIA

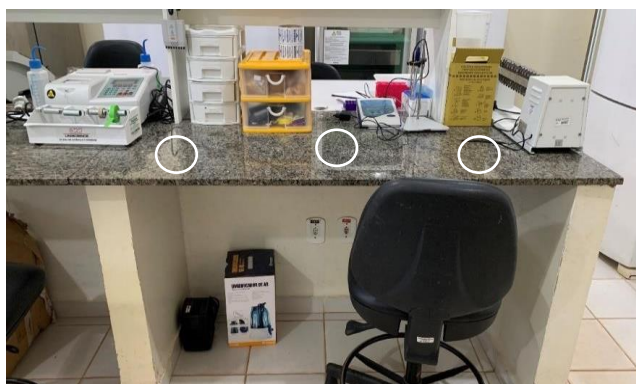
3.1 Locais de coleta

Inicialmente, realizou-se o levantamento dos laboratórios de pesquisa que trabalham com manipulação direta e/ou indireta de microrganismos sendo identificados onze. Desses foram escolhidos 3 laboratórios para realização das coletas, de forma aleatória.

Os laboratórios escolhidos para coleta foram nomeados como LAB1, LAB2 e LAB3.

Na Figura 2, observa-se um exemplo de uma das bancadas que foram analisadas e superfície de coleta. Como a universidade conta com um padrão de uniformidade na construção, as bancadas dos outros laboratórios também analisados são similares a esta.

Figura 2 – Bancada LAB 1 com os locais da triplicata de coleta identificados com círculos brancos.



Fonte consultada: Rômulo Arruda

3.2 Coleta e isolamento de microrganismos

Para análise da contaminação microbiológica, as amostras foram coletadas em bancadas de trabalho, cabine de segurança biológica e estufas de crescimento

microbiano dos laboratórios selecionados. Nesse sentido, a coleta foi realizada utilizando *swabs* estéreis friccionados em uma área de 10cm², que para o objetivo do trabalho proposto, seria o suficiente para encontrar uma variedade considerável de microrganismos. Em cada área foram realizadas 3 coletas.

Após a passagem dos *swabs* eles foram imediatamente inoculados no meio Ágar Triptona de Soja (TSA) e no meio Ágar MAcConkey por estriamento em superfície. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C de 24 a 48 horas e então as colônias foram contadas. Em seguida, os diferentes morfotipos de colônias observadas após o crescimento foram reisoladas por meio de estrias compostas no ágar TSA. As placas foram mantidas de 24 a 48 horas em estufa bacteriológica a 37°C. Os microrganismos isolados foram conservados em meio líquido TSB acrescido de 20% de glicerol e mantidos conservados a -20°C em estufa microbiológica.

Figura 3 – A imagem representa a área de contato de fricção do *swab* nas superfícies.



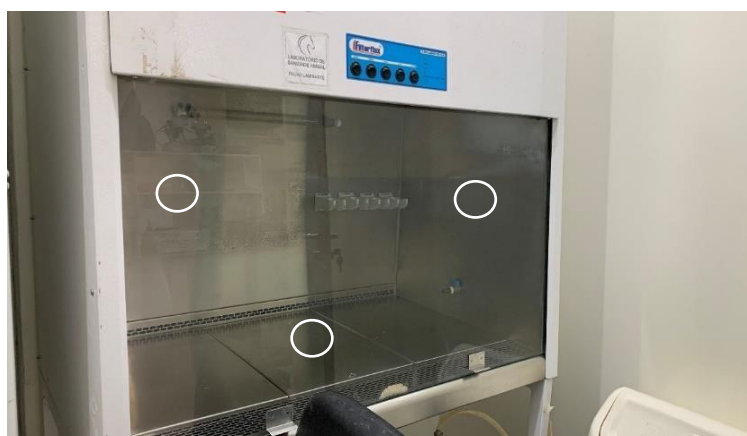
Fonte consultada: Rômulo Arruda

Figura 4 – A imagem representa a área de coleta em triplicata identificados com círculos brancos na Estufa – LAB 1



Fonte consultada: Rômulo Arruda

Figura 5 – A imagem representa a área de coleta em triplicata identificados com círculos brancos no Fluxo Laminar – LAB 2



Fonte consultada: Rômulo Arruda

Figura 6 – Meios de cultura autoclavados, da direita para esquerda, Ágar MacConkey, Ágar TSA e Ágar TSB.



Fonte consultada: Rômulo Arruda

3.3.1 Identificação dos isolados

Para identificação morfológica os isolados foram submetidos à coloração de Gram e visualizados em microscópio óptico no aumento de 400x.

Para identificação genética, inicialmente procedeu-se a extração do DNA. Para tanto, os microrganismos foram cultivados em meio TSB por 24 horas a 37°C e então lavados duas vezes em tampão fosfato salino (K_2HPO_4 , KH_2PO_4) pH 7,0. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram homogeneizados em tampão de lise (10 mM Tris, pH 7.4, 10 mM NaCl, 25 mM EDTA, 1% dodecil sulfato sódico) (DOS SANTOS *et al.*, 2016). Em seguida foi adicionado a cada amostra 50µl/ml de proteinase K e procedeu-se a incubação a 42°C por uma hora. Concomitantemente, em algumas amostras também foram realizados ciclos de congelamento e descongelamento sequenciais para contribuir com o rompimento das paredes celulares.

Após esse passo, foi adicionado o mesmo volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e as amostras foram cuidadosamente misturadas por inversão dos tubos por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 14.000g em 4°C e então a fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde procedeu-se a precipitação com acetato de sódio 3M pH 3,0 e álcool etílico gelado.

Os tubos foram levados ao congelador por 2 horas e em seguida centrifugados por 30 minutos a 14000g em 4°C. Os pellets foram lavados com etanol 70% gelado e ressuspensos em água ultrapura estéril. A concentração do DNA foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1% (m/v).

- PCR

A amplificação da região V3/V4 do gene 16S rRNA foi realizada utilizando primers 341F (5'-CCT ACG GGR SGC AGC AG-3') e 806R (5'-GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3'). Cada reação de PCR continha 3 mM $MgCl_2$, Tampão PCR 1X, 0.2 mM de cada dNTP (Promega, São Paulo, Brasil), 5 pmol cada primer, 0.05 U/µL de Taq DNA polymerase (Promega, São Paulo, Brasil), e 1.5 µL de DNA molde. As condições do PCR foram 30 ciclos de 94°C por 20s, 55°C por 15s e 72 °C por 60s.

No caso das leveduras foram utilizadas os primers que amplificam a região ITS do gene 18S rRNA, ITS1 (5'-TTCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Cada reação de PCR continha 3 mM $MgCl_2$,

Tampão PCR 1X, 0.2 mM de cada dNTP (Promega, São Paulo, Brasil), 5 pmol cada primer, 0.05 U/ μ L de Taq DNA polymerase (Promega, São Paulo, Brasil), e 1.5 μ L de DNA molde. As condições do PCR foram 35 ciclos de 94 °C por 30s), 55 °C por 30s e 72 °C por 1 min e 30s.

Os fragmentos de DNA foram sequenciados em sequenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems). As sequências foram processadas usando o software BLASTn e comparadas com banco de dados do National Center for Biotechnology Information, NCBI Blast.

3.3.2 Teste de sensibilidade aos antibióticos

Para testar a sensibilidade dos microrganismos isolados a antibióticos, bactérias pertencentes a espécies com potencial patogênico foram submetidas ao antibiograma. Para tanto, foram cultivados em meio TSB por 24 horas a 37°C. Em seguida foram centrifugados a 3000 RPM, e o sedimento ressuspendido em 10 mL de salina 0,9% NaC estéril. Esse procedimento de lavagem foi repetido 3 vezes e então os sedimentos foram diluídos em salina até que alcançassem a turvação correspondente a 0,5 na escala MacFarland.

Cada bactéria foi inoculada com o auxílio de swabs em placas de ágar Muller Hinton, em seguida foram depositadas sobre a superfície do ágar discos contendo os antibióticos a serem testados. A suscetibilidade das bactérias foi testada contra os seguintes antibióticos: ciprofloxacina (LABORCLIN, Brasil, 5 μ g), cefalotina (LABORCLIN, Brasil, 30 μ g), penicillina G (CECON, Brasil, 10 μ g), azitromicina (CECON, Brasil, 15 μ g), amoxicilina+clavulanato (SENSIFAR®, Brasil, 30 μ g). As zonas de inibição ao redor dos discos foram medidas e o padrão de sensibilidade foi definido de acordo com Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2006.

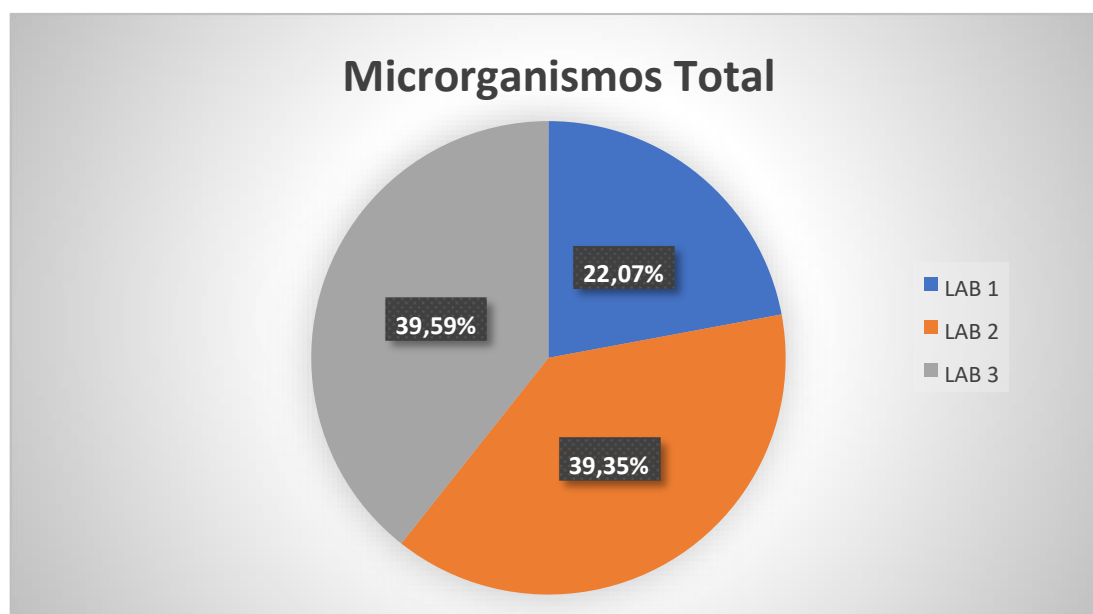
4 RESULTADOS

Na análise das placas após o primeiro cultivo, evidenciou-se um total de 920 microrganismos somando fungos e bactérias em todos os ambientes.

A contagem total mostra que LAB 3 e o LAB 2 apresentaram número próximos de isolados microbianos, pois apresentaram 362 e 355 microrganismos

respectivamente. Em contraste, o LAB 1 que apresentou o menor índice de crescimento microbiano na presente análise totalizando 203 microrganismos.

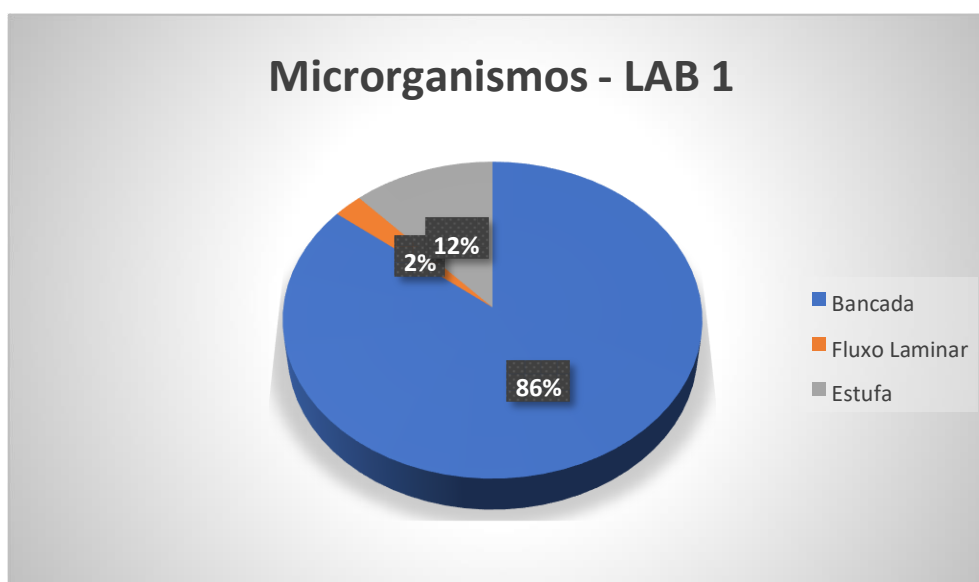
Gráfico 1 – Quantitativo percentual total de todos os microrganismos encontrados nos três laboratórios.



Fonte: autor, fazendo uso dos dados levantados durante o processo de contagem

No laboratório 1, foram encontrados 174 microrganismos na bancada (Figura 12), 24 na estufa microbiológica e 5 no fluxo laminar. Esses dados estão representados no Gráfico 2.

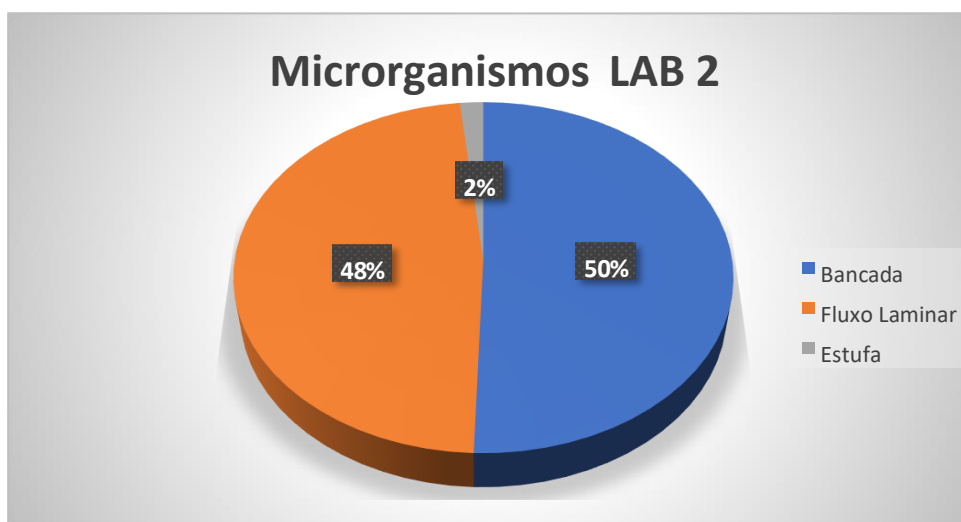
Gráfico 2 – Proporção de microrganismos isolados no LAB 1.



Fonte: autor, fazendo uso dos dados levantados durante o processo de contagem

O Laboratório 2, apresentou 183 microrganismos na bancada (Fig. 13), 6 na estufa microbiológica e 173 no fluxo laminar. Como expresso no Gráfico 3.

Gráfico 3 - Proporção de microrganismos isolados no LAB 2.

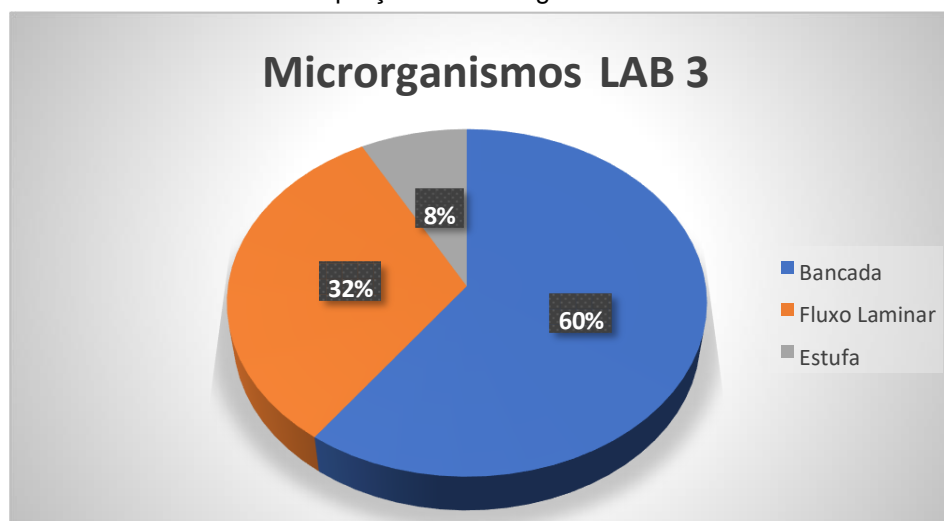


Fonte: autor, fazendo uso dos dados levantados durante o processo de contagem

No LAB 2, a maior concentração se deu na bancada, apresentando 183 microrganismos isolados, o que corresponde a 50% do total encontrado neste laboratório. Diferente do LAB 1, o menor registro foi encontrado na estufa microbiológica com 6 indivíduos ou 2%.

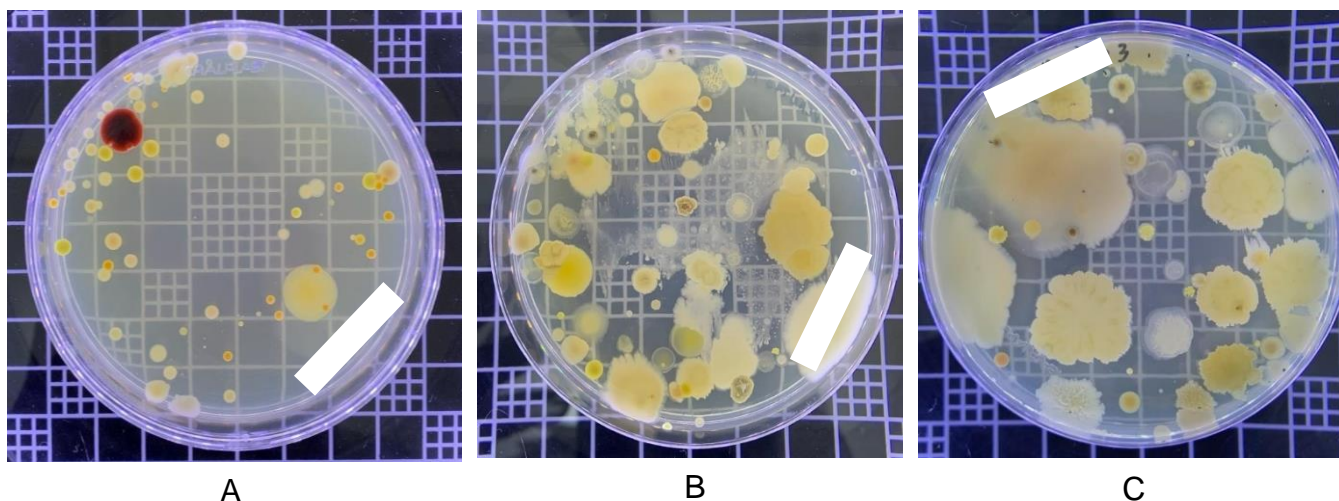
Por fim, o Laboratório 3 correspondente aos 39,59% do total, obteve o maior número de microrganismos na sua bancada com 213 isolados, o que corresponde a 60% da totalidade encontrada neste laboratório (Fig. 14), 114 no fluxo laminar e 28 na estufa microbiológica. Esses dados estão expressos no Gráfico 3

Gráfico 4 - Proporção de microrganismos isolados no LAB 3.



Fonte: autor, fazendo uso dos dados levantados durante o processo de contagem

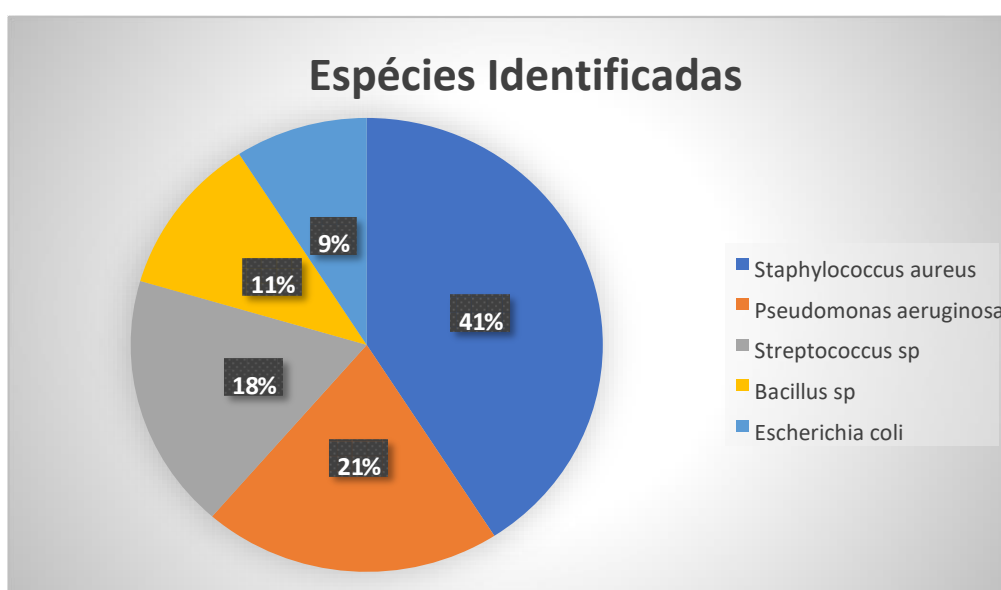
Figura 7 – Diferença de quantidade de microrganismos encontrados nas bancadas, representados por uma placa de cada laboratório sendo LAB 1 (A), LAB 2 (B) e LAB 3 (C).



Fonte: Rômulo Arruda

Com os dados da identificação molecular, 20 espécies diferentes entre bactérias e fungos foram identificadas. Constatamos 18 indivíduos da bactéria *Staphylococcus aureus*, (Rosenbach, 1884) representada na figura 15, sendo a espécie com maior ocorrência em todos os laboratórios visitados. A segunda mais expressiva foi *Pseudomonas aeruginosa* com 9 indivíduos, seguido por *Streptococcus sp* com 8 indivíduos de duas espécies. *Bacillus sp* com 5 indivíduos e *Escherichia coli* com 4 indivíduos. As demais espécies apresentaram menos ocorrência.

Gráfico 5 – Quantitativo percentual total dos microrganismos identificados.



Fonte: autor, fazendo uso dos dados levantados durante o processo de contagem

Figura 8 - *Staphylococcus aureus* (Rosenbach, 1884), isolada com técnica de esgotamento em estrias.

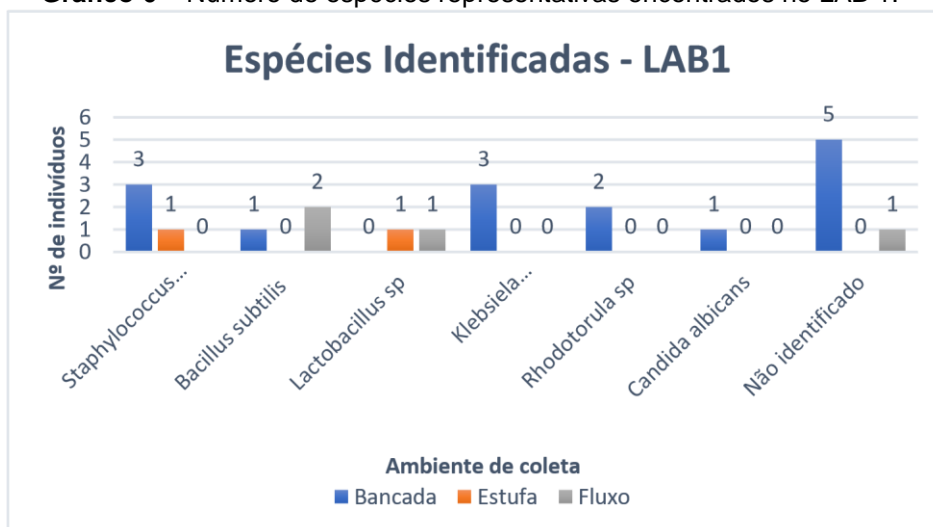


Fonte: Rômulo Arruda

Os microrganismos identificados nos laboratórios foram muito parecidos entre os ambientes, provavelmente em razão de todos serem cultivados no mesmo meio de cultura (TSA), o que de certa forma limita a capacidade de detecção de uma maior diversidade. Além disso, as amostras foram coletadas em ambientes muito similares, então o padrão de microrganismos observado é esperado. À vista disso, a maior concentração de indivíduos foi encontrada nas bancadas.

No Gráfico 5 estão sete espécies representativas encontradas no LAB 1, destes, grande maioria se evidenciou presente na bancada, seguido pelo fluxo laminar e estufa.

Gráfico 6 – Número de espécies representativas encontrados no LAB 1.

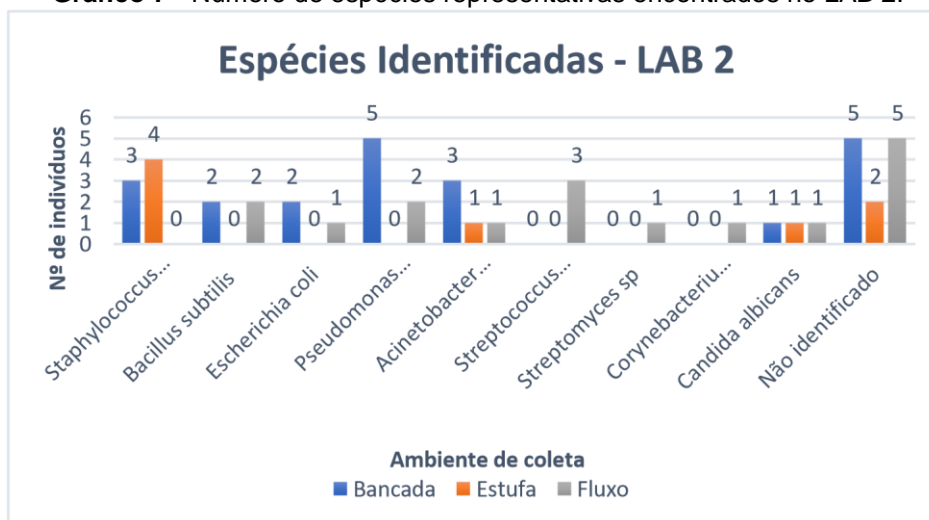


Fonte: autor, fazendo uso dos dados levantados durante o processo identificação molecular

No LAB 2, nove espécies foram identificadas, com maioria presente na bancada. No entanto, nesse laboratório houve um maior contraste de distribuição de

indivíduos nos ambientes diferentes, havendo um equilíbrio entre fluxo laminar e na estufa. A bactéria *Staphylococcus aureus* teve mais indivíduos identificáveis na estufa microbiológica, diferente do LAB 1 (Gráfico 6).

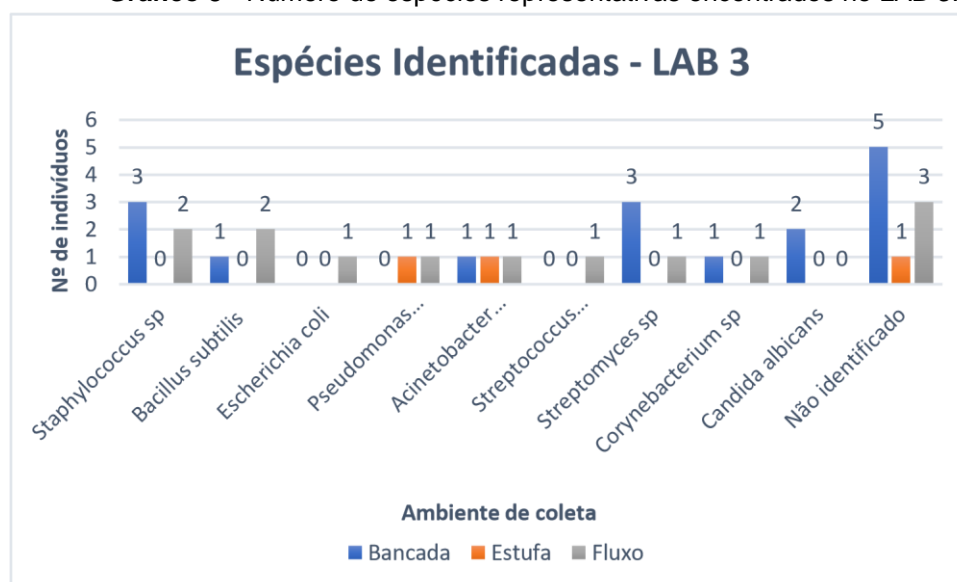
Gráfico 7 - Número de espécies representativas encontrados no LAB 2.



Fonte: autor, fazendo uso dos dados levantados durante o processo identificação molecular

Ao comparar os resultados do LAB 2 com os do LAB 3, existe igual diversidade de espécies, porém demonstra pouca expressividade de indivíduos em todos os ambientes de coleta. *Staphylococcus sp* e *Streptomyces sp* destacaram como maior número na bancada, e poucos indivíduos no fluxo e estufa comparados aos dados do LAB 2.

Gráfico 8 - Número de espécies representativas encontrados no LAB 3.



Fonte: autor, fazendo uso dos dados levantados durante o processo identificação molecular

Alguns microrganismos não puderam ser identificados por dificuldades no processo de extração de DNA, purificação do material e sequenciamento. Nesse sentido, a identificação desses microrganismos posteriormente pode alterar a diversidade apresentada e discutida no presente trabalho.

Logo abaixo a Tabela 4 apresenta todas as espécies que puderam ser identificadas pelos procedimentos de identificação molecular, tendo como base o PCR e a comparação de sequenciamento genético com sequências decodificadas e disponíveis no banco de dados do National Center for Biotechnology Information, NCBI Blast.

Tabela 4 – Lista de espécies identificadas e os ambientes coletados divididos em bancada – BAN, Estufa – EST e Fluxo laminar – FLU.

Código interno	Espécie identificada
LAB 1 – BAN1	<i>Staphylococcus aureus</i>
LAB 1 – BAN2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LAB 1 – BAN3	<i>Bacillus subtilis</i>
LAB 1 – BAN4	Não identificado
LAB 1 – BAN5	<i>Staphylococcus aureus</i>
LAB 1 – BAN6	Não identificado
LAB 1 – BAN7	Não identificado
LAB 1 – BAN8	<i>Rhodotorula glutinis</i>
LAB 1 – BAN9	<i>Staphylococcus aureus</i>
LAB 1 – BAN10	<i>Candida albicans</i>
LAB 1 – BAN11	<i>Rhodotorula sp</i>
LAB 1 – BAN12	Não identificado
LAB 1 – BAN13	Não identificado
LAB 1 - EST1	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LAB 1 - EST2	<i>Staphylococcus aureus</i>
LAB 1 - FLU1	<i>Lactobacillus fermentum</i>
LAB 1 - FLU2	<i>Bacillus sp</i>
LAB 1 - FLU3	Não identificado
LAB 1 - FLU4	<i>Bacillus subtilis</i>
LAB 2 - BAN1	Não identificado
LAB 2 - BAN2	Não identificado
LAB 2 - BAN3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
LAB 2 - BAN4	<i>Staphylococcus aureus</i>
LAB 2 - BAN 5	Não identificado
LAB 2 - BAN6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
LAB 2 - BAN7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
LAB 2 - BAN8	<i>Escherichia coli</i>
LAB 2 - BAN9	<i>Sporobolomyces oryziicola</i>
LAB 2 - BAN10	Não identificado
LAB 2 - BAN11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
LAB 2 - BAN12	<i>Bacillus sp</i>
LAB 2 - BAN13	<i>Candida sp</i>

LAB 2 - BAN14	<i>Staphylococcus aureus</i>
LAB 2 - BAN15	<i>Escherichia coli</i>
LAB 2 - BAN16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
LAB 2 - BAN17	<i>Bacillus</i> sp
LAB 2 - BAN18	<i>Staphylococcus aureus</i>
LAB 2 - BAN19	Não identificado
LAB 2 - FLU1	Não identificado
LAB 2 - FLU2	<i>Candida albicans</i>
LAB 2 - FLU3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
LAB 2 - FLU4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
LAB 2 - FLU5	<i>Staphylococcus aureus</i>
LAB 2 - FLU6	<i>Staphylococcus aureus</i>
LAB 2 - FLU7	<i>Bacillus subtilis</i>
LAB 2 - FLU8	<i>Streptomyces</i> sp
LAB 2 - FLU9	Não identificado
LAB 2 - FLU10	<i>Escherichia coli</i>
LAB 2 - FLU11	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>
LAB 2 - FLU12	<i>Streptococcus thermophilus</i>
LAB 2 - FLU13	<i>Acinetobacter baumannii</i>
LAB 2 - FLU14	Não identificado
LAB 2 - FLU15	<i>Bacillus</i> sp
LAB 2 - FLU16	<i>Streptococcus thermophilus</i>
LAB 2 - FLU17	<i>Acinetobacter baumannii</i>
LAB 2 - FLU18	Não identificado
LAB 2 - FLU19	Não identificado
LAB 2 - FLU20	<i>Streptococcus thermophilus</i>
LAB 2 - EST1	<i>Acinetobacter baumannii</i>
LAB 2 - EST2	Não identificado
LAB 2 - EST3	<i>Staphylococcus aureus</i>
LAB 2 - EST4	<i>Candida albicans</i>
LAB 2 - EST5	<i>Staphylococcus aureus</i>
LAB 2 - EST6	<i>Staphylococcus aureus</i>
LAB 2 - EST7	Não identificado
LAB 2 - EST8	<i>Staphylococcus aureus</i>
LAB 3 - BAN1	Não identificado
LAB 3 - BAN2	Não identificado
LAB 3 - BAN3	Não identificado
LAB 3 - BAN4	Não identificado
LAB 3 - BAN5	<i>Corynebacterium</i> sp
LAB 3 - BAN6	<i>Streptomyces</i> sp
LAB 3 - BAN7	<i>Bacillus</i> sp
LAB 3 - BAN8	<i>Staphylococcus aureus</i>
LAB 3 - BAN9	Não identificado
LAB 3 - BAN10	<i>Acinetobacter</i> sp
LAB 3 - BAN11	<i>Staphylococcus aureus</i>
LAB 3 - BAN12	<i>Streptomyces</i> sp
LAB 3 - BAN13	<i>Streptomyces</i> sp
LAB 3 - BAN14	<i>Candida albicans</i>
LAB 3 - BAN15	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
LAB 3 - BAN16	<i>Rhodotorula</i> sp
LAB 3 - BAN17	<i>Candida</i> sp
LAB 3 - EST1	Não identificado

LAB 3 - EST2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
LAB 3 - FLU1	<i>Streptococcus thermophilus</i>
LAB 3 - FLU2	Não identificado
LAB 3 - FLU3	<i>Staphylococcus aureus</i>
LAB 3 - FLU4	Não identificado
LAB 3 - FLU5	Não identificado
LAB 3 - FLU6	<i>Staphylococcus aureus</i>
LAB 3 - FLU7	<i>Escherichia coli</i>
LAB 3 - FLU8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Fonte: autor, utilizando dados de identificação e quantificação

- Antibiograma

O antibiograma consistiu na seleção de cinco espécies escolhidas aleatoriamente para o teste de resistência microbiana à cinco tipos de antibióticos representativos utilizados no tratamento de infecções. As bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, ambas mostraram resistência à Penicilina, Azitromicina e sensibilidade aos demais antibióticos, enquanto *Staphylococcus aureus* apresentou resistência somente à Penicilina. Já as bactérias *Bacillus subtilis* e *E. coli* mostraram sensibilidade a todos os antibióticos. Esses dados obtidos estão disponíveis na Tabela 5, onde **R** indica resistência e **S** indica sensibilidade.

Tabela 5 – Teste de antibiograma realizado em algumas bactérias, onde **R** indica resistência e **S** indica sensibilidade.

Antibiótico

Bactéria	Antibiótico				
	Penicilina	Amoxicilina- Ciprofloxacina	Amoxicilina- clavulanato	Cefalotina	Azitromicina
<i>Staphylococcus aureus</i>	R	S	S	S	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	S	S	R	S
<i>Bacillus subtilis</i>	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	S	S	R	S

Fonte: autor, utilizando dados de quantificação

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho buscou identificar a diversidade de microrganismos contaminantes de superfícies de trabalho em laboratórios da UFOPA. A relação de muitas espécies que apresentam microrganismos contaminantes no ambiente de laboratório foi encontrada também nos estudos realizados por Oliveira *et al.* (2007), Gomes *et al.* (2016) e nos estudos realizados por Rodrigues (2016).

Furlan *et al.* (2019), Miranda (2018) e Sousa *et al.* (2022), que evidenciaram que a contaminação por falha nos procedimentos de desinfecção é comum para todos esses ambientes.

A presença de altos níveis de bactérias, ou a presença de um tipo incomum de microrganismo em um ambiente hospitalar ou laboratorial, indica a ocorrência de fontes de proliferação de microrganismos no interior do ambiente ou deficiência de métodos que possam determinar a destruição dos mesmos (RODRIGUES, 2016). A manipulação de materiais sem o uso de luvas, abre a possibilidade de transferência de microrganismos para as mãos dos profissionais e das mãos para os materiais manipulados (EVANGELISTA, 2019).

Do Couto (2011) elenca que contaminação cruzada ocorre devido ao uso de utensílios, equipamentos, panos, flanelas, mãos, entre outros, em vários ambientes, transferindo microrganismos de um local contaminado a outro não contaminado.

Assim, uma superfície “limpa” ou mesmo um alimento seguro, do ponto de vista higiênico-sanitário, podem ser contaminados por microrganismos trazidos de outros locais. Levando isso em consideração, observou-se o crescimento e presença de bactérias em todas as amostras (PINHEIRO; WADA; PEREIRA, 2010).

Os resultados encontrados por Furlan *et al.* (2019), em um levantamento feito para avaliar a correlação entre cultura microbiológica e eficiência da limpeza e da desinfecção de superfícies, provam que a inspeção visual ainda é o método mais comum para avaliar a eficiência da limpeza e da desinfecção de superfícies clínicas altamente tocadas. No entanto, os achados desse estudo comprovam que a inspeção visual por si só não é suficiente para garantir a qualidade do processo, sendo necessário documentar o nível de limpeza e de desinfecção por métodos quantitativos (FURLAN *et al.*, 2019).

É recomendável que a supervisão técnico-científica do laboratório esteja a cargo de médico ou profissional de nível superior, especializado em microbiologia, e,

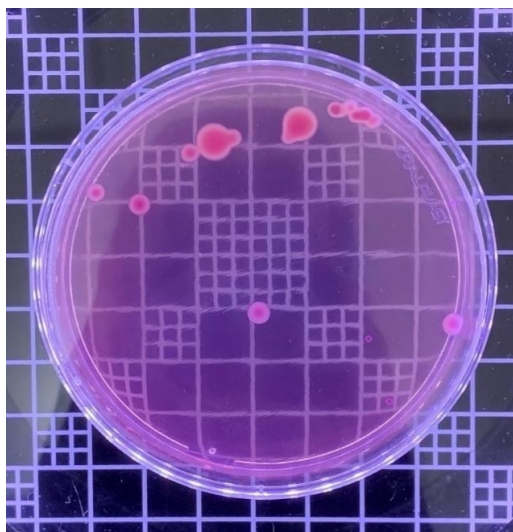
se possível, em tempo integral (ANVISA, 2017). A higienização das bancadas, mobiliário de laboratório, bem como os aparelhos de análise, deve ser feitas pelos técnicos de laboratórios. Vale ressaltar que dos três laboratórios, apenas um dos deles (LAB 1), havia a presença de avisos sobre os cuidados a serem tomados e até algumas normas de biossegurança para as pessoas que ali fizessem experimentos, ficassem cientes das possíveis vias de contaminação.

Dos 20 microrganismos identificados durante a execução do trabalho, três espécies se destacam: *Klebsiella pneumoniae*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* e *Acinetobacter baumannii*.

A *Klebsiella pneumoniae* é um patógeno bacteriano oportunista conhecido por sua alta frequência e diversidade de genes de resistência antimicrobiana. Além de ser um problema clínico significativo por si só, *K. pneumoniae* é a espécie dentro da qual vários novos genes de resistência foram descobertos pela primeira vez antes de se espalharem para outros patógenos (por exemplo, genes de resistência ao carbapenema KPC, OXA-48 e NDM-1) (WYRES; HOLT, 2018).

A patogenicidade da *K. pneumoniae* pode ser designada à produção de enterotoxina estável ao calor; à destreza de metabolizar a lactose; à presença de adesinas com ou sem fímbrias que auxilia sua fixação às mucosas das células epiteliais do trato urogenital, respiratório e intestinal para causar o processo infeccioso, e proteger a bactéria dos fatores bactericidas do soro acompanhado pela interrupção da ativação dos componentes do complemento (ALENCAR, 2016).

Figura 9 – *Klebsiella pneumoniae* (Trevisan, 1887), isolada no meio MacConkey.



Fonte: Rômulo Arruda

A *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* é encontrada como parte da flora normal do trato respiratório superior dos seres humanos, no entanto, também é

reconhecido como um patógeno do trato respiratório em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos (CANTARELLI, 2008). Outras infecções causadas por este organismo incluem queratite, conjuntivite e endocardite. Recentemente, foi relatado uma lesão ulcerativa na mão de um paciente sugerindo que este organismo é um potencial patógeno da pele.

Corynebacterium pseudodiphtheriticum é geralmente considerado suscetível a agentes β -lactâmicos, aminoglicosídeos, rifampicina e vancomicina. A suscetibilidade à ciprofloxacina, lincomicina e tetraciclina foi encontrada variável na literatura. Com exceção da atividade invariável da vancomicina e teicoplanina contra *Coryne. pseudodiphtheriticum*, a variabilidade na resistência a outras classes de agentes antimicrobianos enfatiza a necessidade de vigilância contínua de seus padrões de resistência (CAMELLO *et al.*, 2009).

Acinetobacter baumannii surgiu como patógeno hospitalar oportunista, sendo que numerosos surtos hospitalares têm sido documentados. Atualmente, o gênero compreende até 31 espécies, e a espécie em questão, pode se espalhar de forma epidêmica entre pacientes hospitalizados e gravemente doentes (SCARELLA; SCARELLA; BERETA, 2020).

O microrganismo tem como alvo pacientes hospitalizados mais vulneráveis, principalmente aqueles que estão criticamente doentes, com quebras de integridade da pele e com comprometimento das vias aéreas, como relatos que remontam à década de 1970. A pneumonia ainda é a infecção mais comum causada por esta bactéria, no entanto, recentemente, infecções envolvendo o sistema nervoso central, pele, tecidos moles e ossos surgiram como problemáticas para algumas instituições (KYRIAKIDIS *et al.*, 2021)

Esta espécie está emergindo como umas das causas de numerosos surtos globais, apresentando taxas crescentes de resistência e sendo relatados vários casos em hospitais ao redor do mundo incluindo o Brasil, América do Norte, Argentina, China, Taiwan, Hong Kong, Japão e Coreia do Sul (SCARELLA; SCARELLA; BERETA, 2020).

Deve-se destacar com cautela, as outras espécies expressivas e que passaram pelo antibiograma, tais como *Staphylococcus aureus* que faz parte da microbiota humana, mas que pode provocar doenças que vão desde uma infecção simples, como espinhas e furúnculos, até as mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia, entre outras (SANTOS *et al.*, 2007). E

Escherichia coli vivem nos intestinos e raramente causa doenças em indivíduos saudáveis. No entanto, uma série de cepas patogênicas podem causar diarreia ou doenças extra-intestinais, tanto em indivíduos saudáveis quanto imunocomprometidos (GOMES *et al.*, 2016).

Pela perspectiva de Damasceno *et al.* (2012), novas resistências à grupos de antibióticos testados ou até outros demonstra a grande importância de novos estudos que proporcionem o conhecimento sobre os níveis patogênicos e como o nosso organismo reage a essas infecções.

O antibiograma é uma técnica destinada à determinação da sensibilidade bacteriana *in vitro* frente a agentes antimicrobianos, cuja finalidade é verificar os antibióticos mais indicados para o tratamento da infecção bacteriana. A formação de halos indica a quais antibióticos a bactéria é sensível (MACEDO; CANUTO; DUARTE, 2014). Esse teste mostra grande relevância ao representar uma alternativa na identificação dos organismos multirresistentes (DAMACENO *et al.*, 2012).

Alunos, professores ou quaisquer pessoas que frequentem o laboratório, e que porventura tenham baixa imunidade ou que estejam nessa condição, estão mais susceptíveis a uma infecção, exatamente por esse fator contribuir para invasão no hospedeiro, causando a infecção por bactérias oportunistas.

O resultado da análise mostrou que existe variabilidade na concentração microbiana a depender do local analisado. É possível observar que no Fluxo Laminar do LAB 1 houve isolamento de poucos microrganismos, quando comparado a bancada do mesmo laboratório ou de outros ambientes. Esse fato pode ser devido ao fluxo ser usado com frequência e num contexto de necessidade de limpeza ou até mesmo esterilidade e por isso passar por protocolos de limpeza mais rígidos, a exemplo da descontaminação com luz UV. A falta de porosidade do material do fluxo laminar também pode ser apontada como um fator que contribui com a limpeza do equipamento.

Também é digno de nota que o número reduzido de microrganismos na estufa do LAB 3 pode ser devido a no momento da coleta ela não estar sendo utilizada para cultivo de microrganismos ou qualquer atividade de incubação.

A expressiva quantidade de microrganismos encontradas em todas as bancadas, pode ser explicada pela sua maior frequência de uso, uso de métodos químicos de controle de crescimento como álcool 70%, que nem sempre são suficientes, além de servirem não apenas para experimentação como suporte para

todo tipo de material resultante de coletas que vem de fora dos laboratórios e que pode carregar ainda mais microrganismos e proporcionando a contaminação cruzada (DO Couto, 2011).

Na presente análise, constatou-se que percentuais elevados das bactérias e fungos encontrados, estavam presentes em todos os laboratórios, que não atendiam os parâmetros recomendados pela OPAS, o que comprova que as condições higiênicas das bancadas, fluxos laminares e estufas, devem ser melhoradas para minimizar os riscos de infecções e contaminações em experimentos que sejam realizados.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- I. As análises feitas nos laboratórios de pesquisa da UFOPA – Santarém - PA apresentaram higienização inadequada nos locais de manipulação de microrganismos. Condições inadequadas de limpeza e desinfecção podem contribuir tanto para infecção por bactérias oportunistas às pessoas que trabalham nos laboratório, tal como a contaminação dos experimentos, gerando atraso nas pesquisas, desperdício de material e recursos financeiros.
- II. Nesse sentido, medidas como o treinamento dos acadêmicos e funcionários das terceirizadas e a implementação de boas práticas de higienização devem ser empregadas, bem como protocolos de limpeza definidos e padronizados para os laboratórios.
- III. Porquanto, torna-se necessária a criação de uma regulamentação que estabeleça padrões de controle microbiológico adequados para laboratórios de pesquisa nas universidades, como também o incentivo a estudos acadêmicos nas boas práticas de biossegurança, corroborando com experimentos sem contaminações e com resultados satisfatórios.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, Maria Patrício Ivo et al. *Klebsiella pneumoniae*: Uma revisão bibliográfica. **Anais da Mostra de Biomedicina da Uicatólica**. Disponível em: <https://www.ptonline.com/articles/how-to-getbetter-mfi-result>. [S. l.], v. 1, n. 88, 2016.

ANDREI, A.; ZERVOS, M. J. The application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Arch Pathol Lab Med**, v. 130, n. 5, p. 662-668, 2006.

ANVISA. **Limpeza e Desinfecção de Superfícies**. Disponível em: <http://www.starlimprs.com.br/images/manual-limpeza.Ahttp://files/92/1c9cda1eda04-4221-9bd1-99def896b2b5.pdf>. [S. l.], 2017.

BRASIL. Manual de Procedimentos Básicos em MICROBIOLOGIA CLÍNICA para o Controle de Infecção Hospitalar. *E-book*. [S. l.: s. n.], 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 184, de 22 de outubro de 2001**. Altera a Resolução 336, de 30 de julho de 1999. Diário Oficial da União, Brasília, 23 outubro, Seção 2, p. 1. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 40 de 05 de junho de 2008**. Aprova o Regulamento técnico para Produtos de Limpeza e Afins harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº 47/07. Diário Oficial da União, Brasília, 06 junho, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007**. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº 50/06. Diário Oficial da União, Brasília, 05 de março, 2007.

BRASIL. Ministério da saúde. Coordenação de controle de Infecção. Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde. Brasília, 1994.

BRASIL. Ministério da saúde. **Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976**. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 24 de setembro, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Vigilância Sanitária. **Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988**. Estabelece normas para registro dos saneantes domissanitários com ação antimicrobiana. Diário Oficial da União, Brasília, 05 de setembro, 1988.

CAMELLO, T. C. F. et al. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* isolated from relevant clinical sites of infection: a human pathogen overlooked in emerging countries. **Letters in applied microbiology**. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02553.x>. [S. l.], v.

48, p. 458–464, 2009.

CANTARELLI, Vlademir Vicente et al. Case Report Cutaneous Infection caused by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. **Revista de Medicina Tropical de São Paulo**. [S. l.], v. 50, n. 1, p. 51–52, 2008.

CAPÓ, Yelenys Alvarado. Control y prevención de la contaminación microbiana en la micropropagación de plantas. **Revista CENIC ciencias biológicas**, [S. l.], v. 31, p. 87–91, 2000.

DA ROSA, Rosângela Aquino. Uso De Alta Pressão Hidrostática Em Presunto Fatiado: Avaliação Físico-Química E Sensorial E Modelagem Do Crescimento Microbiano. **Revista Trabalho Necessário**, [S. l.], v. 18, n. 35, p. 363, 2020.

DAMACENO, Leandro et al. A Resistência Bacteriana e a importância do antibiograma nessa problemática. **IV Encontro Universitário da UFC no Cariri - 2012**. Disponível em:
<https://conferencias.ufca.edu.br/index.php/encontrosuniversitarios/eu2012/paper/view/885>. [S. l.], p. 17–20, 2012.

DAMASO, Autores Gilberto et al. Controle Microbiano e Monitoramento em Salas Limpas de Processamento Asséptico. **SBCC**. [S. l.], 2016.

DO COUTO, Hilma. Limpeza nos Laboratórios: **Procedimentos e Cuidados Especiais**.. Disponível em: http://w2.fop.unicamp.br/cibio/downloads/limpeza_lab.pdf. [S. l.], p. 22, 2011.

DOS SANTOS, T. F. et al. Efficacy of oral administration of lactic acid bacteria isolated from cocoa in a fermented milk preparation: Reduction of colitis in an experimental rat model. **Genetics and Molecular Research**. Disponível em: <https://doi.org/10.4238/gmr.15038097>. [S. l.], v. 15, n. 3, 2016.

DUARTE, Eduardo Robson. **Microbiologia Básica para Ciências Agrárias**. 1. ed. Montes Claros - Minas Gerais: [s. n.], 2011. *E-book*. [s. n.], 2011.

EVANGELISTA, Síntia de Sousa. Eficácia da limpeza manual versus limpeza automatizada para remoção de *Staphilococcus epidermidis* aderido à superfície de instrumental cirúrgico em diferentes intervalos por contaminação experimental. **Repositório Institucional da UFMG**, [S. l.], v. 8, n. 5, p. 55, 2019.

FERNANDEZ, Myriam Rosa. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Disponível em:
<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/815639/1/CNPTDOCUMENTOS6MANUALPARALABORATORIODEFITOPATOLOGIALV200801273.pdf>. [S. l.], 1993.

FURLAN, Mara Cristina Ribeiro *et al.* Correlation among monitoring methods of surface cleaning and disinfection in outpatient facilities. **ACTA Paulista de Enfermagem**. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1982-0194201900039>. [S. l.], v. 32, n. 3, p. 282–289, 2019.

GOMES, Roberta Cristina *et al.* Correlação Entre Baixas Temperaturas E O Controle Da Contaminação Microbiana Nos Fluidos De Corte. **IV Congresso Brasileiro de Engenharia de Fabricação**. Águas de São Paulo. [S. l.], n. 1-8, 2007.

GOMES, Tânia A. T. *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>. [S. l.], v. 47, p. 3–30, 2016.

HENRIQUE, Míriam Roberta; FILHO, Waldemar Wenturini Gastoni. Relação Da Concentração Dos Compostos Fenólicos No Mosto Com a Viabilidade Celular, Viabilidade De Brotamento E a Taxa De Brotamento Celular Da Levedura Alcoólica. **Energia Na Agricultura**. Disponível em: <https://doi.org/10.17224/energagric.2016v31n1p80-88>. [S. l.], v. 31, n. 1, p. 80, 2016.

KYRIAKIDIS, Ioannis *et al.* *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms. **MDPI Pathogens**. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens10030373>. [S. l.], v. 10, n. 3, p. 1–31, 2021.

LACERDA, Vânia Amaro de. Avaliação de métodos de desinfecção/esterilização e seus efeitos sobre a morfologia das pontas polidoras de resina composta. **Universidade Federal do Rio de Janeiro**. [S. l.], 2013.

LIMA, Janína Santiago; Braga Angela Reksidler. Controle Microbiano e a microbiota normal das mãos das alunas de enfermagem. **Revista Ciências da Saúde Unisantacruz**. [S. l.], n.2. p. 1, 2015.

MACEDO, Jhenifer Sandra Minhano; CANUTO, Sostenes; DUARTE, Juliana Maria Ambile. Teste de antibiograma pela técnica de difusão em discos no controle de espécies bacterianas em culturas puras. **Seminário Transdisciplinar da Saúde**. [S. l.], p. 4628, 2014.

MADIGAN *et al.* Brock: **Biology of Microorganisms**. [S. l.], n. May, p. 95–119, 2015.

MENEZES, Cristiano Ragagnin de *et al.* Efeito de radiação por microondas na inativação de cepas de *Escherichia coli*. **Higiene Alimentar 30**. Disponível em: <http://pesquisa.bvsalud.org/bvs-vet/resource/pt/vti-16010>. [S. l.], v. 30, p. 157–161, 2016.

MIRANDA, Barbara Elen Priscila De *et al.* Utilização da água sanitária no controle bacteriano pela técnica do antibiograma. **Seminário Transdisciplinar da Saúde**. [S. l.], p. 4628, 2014.

MOURA, LÍVIA DE AQUINO GARCIA. Caracterização E Predição Da Cinética De Crescimento Microbiano Via Práticas Estereológicas. **Universidade Federal do Rio de Janeiro**. [S. l.], 2018.

NICOLAU, P. Microorganismos e Crescimento Microbiano. **Universidade Aberta**, Disponível em : https://repositorioaberto.uab.pt/bitstream/10400.2/6137/1/UT2_Microorganismos_e_crescimento_microbiano_PBN.pdf. [S. l.], p. 2–5, 2014.

OLIVEIRA, Karla Semim De *et al.* Avaliação da eficácia do método de esterilização pelo calor seco e calor úmido em sugadores endodônticos reutilizáveis. **Arquivo Brasileiro de Odontologia**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 11–18, 2008.

OLIVEIRA, O. R. de *et al.* **Avaliação dos níveis de contaminação bacteriana em laboratórios de cultura de tecidos de plantas**. [S. l.: s. n.], 2007.

PENNA, P. M. M. *et al.* Biossegurança: Uma Revisão. **Arquivos do Instituto Biológico**, Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1808-1657v77p5552010>. [S. l.], v. 77, n. 3, p. 555–565, 2010.

PINELLI, Camila *et al.* Biossegurança e odontologia: Crenças e atitudes de graduandos sobre o controle da infecção cruzada. **Saúde e Sociedade**. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-12902011000200016>. [S. l.], v. 20, n. 2, p. 448–461, 2011.

RODRIGUES, Juliano Aquino. Avaliação de contaminação bacteriana de mobiliário de laboratório de microbiologia de uma universidade do Rio Grande do Sul. **Rbac**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 68–73, 2016.

RUI, Bruno Rogério *et al.* Principais Métodos De Desinfecção E Desinfetantes Utilizados Na Avicultura: Revisão De Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, [S. l.], v. 16, p. 14, 2011.

SALUD, D. E. The Importance of Hand Hygiene in the Control of Infections in Health. **RAS** 4. Disponível em: <https://doi.org/10.5205/reuol.8200-71830-3-SM.1006sup201621>. [S. l.], v. 10, p. 4880– 4884, 2016.

SANGIONI, L. A. *et al.* Principles of biosafety applied to microbiology and parasitology laboratories in universities. **Ciencia Rural**. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012005000122>. [S. l.], v. 43, n. 1, 2013.

SANTOS, André Luis *et al.* Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar Staphylococcus aureus: visiting a strain of clinical importance. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S. l.], v. 43(6), p. 413–423, 2007.

SARMENTO, Felipe José de Queiroz. Desenvolvimento de uma plataforma de bioinformática integrada aplicada a identificação molecular de microrganismos patogênicos. **Universida Federal da Paraíba**. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/9943>. [S. l.], 2013.

SCARELLA, Ana Carolina de Almeida *et al.* Infecção relacionada à assistência à saúde associada a *Acinetobacter baumannii*: **revisão de literatura**. Disponível em: <https://doi.org/10.21877/2448-3877.201600361>. [S. l.], n. April, 2020.

SOUSA, Mariana Fernandes de; *et al.* Eficiência da limpeza e desinfecção de superfícies de uma clínica-escola de Odontologia : visão macroscópica e microscópica The efficiency of cleaning and disinfection of Dental school clinic surfaces: macroscopic and Eficiencia de limpeza y desinfección. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, e11311830770, 2022 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i8.30770>, [S. l.], v. 2022, p. 1–8, 2022.

TORTORA, GERALD J.; FUNKE, Berdell R. **Microbiologia - 12ª edição**. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.15581/021.24.5635>. [S. l.: s. n.], 2017.

TORTORA GJ, FUNKE BR, CASE CL. **Microbiologia 10ª edição**. *E-book*. [S. l.: s. n.], 2012.

WYRES, Kelly L.; HOLT, Kathryn E. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. **Current Opinion in Microbiology**. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.04.004>. [S. l.], v. 45, p. 131–139, 2018.