

CONTROLE MICROBIOLÓGICO DE SUPERFÍCIES EM LABORATÓRIO CLÍNICO: AVALIAÇÃO E DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA

Paulo Jaeder Moraes Cervi¹; Djenifer Letícia Ulrich Bick²; Gabriel Flores Peres²; Gabriéli Farencena Fernandes²; Vitória Bevilacqua Ungaratho²; Rejane Louise de Lima Bastos²; Brenda Moreira dos Santos²; Gerson Fernandes de Brum²

RESUMO

Micro-organismos multirresistentes são uma grave ameaça à saúde pública, capazes de resistir a antibióticos de última linha, como carbapenêmicos e colistina. Este estudo teve como objetivo identificar os genes de resistência *blaKPC*, *blaNDM* e *mcr-1* em amostras coletadas de superfícies em um laboratório clínico, utilizando PCR e qPCR para melhorar o controle e a segurança do ambiente laboratorial. Foram coletadas 35 amostras, incluindo bancadas e maçanetas. As amostras foram incubadas em caldo BHI com meropenem e em ágar MacConkey, resultando em crescimento bacteriano significativo em 15 amostras. A pesquisa por *blaKPC*, *blaNDM* e *mcr-1* não detectou esses genes, mas isso não exclui resistência por outros mecanismos, como *blaOXA-48*, *blaVIM*, bombas de efluxo ou alterações na permeabilidade da membrana celular. Os resultados ressaltam a necessidade de contínuo monitoramento dos mecanismos de resistência para assegurar a segurança dos colaboradores e a integridade do ambiente laboratorial.

Palavras-chave: Ambiente laboratorial; Micro-organismos multirresistentes; PCR e qPCR.

ABSTRACT

Multidrug-resistant microorganisms are a serious public health threat, capable of resisting last-line antibiotics such as carbapenems and colistin. This study aimed to identify the resistance genes *blaKPC*, *blaNDM*, and *mcr-1* in samples collected from surfaces in a clinical laboratory, using PCR and qPCR to improve laboratory control and safety. A total of 48 samples were collected, including from benches and door handles. The samples were incubated in BHI broth with meropenem and on MacConkey agar, resulting in significant bacterial growth in 15 samples. Testing for *blaKPC*, *blaNDM*, and *mcr-1* did not detect these genes; however, this does not exclude resistance through other mechanisms, such as *blaOXA-48*, *blaVIM*, efflux pumps, or changes in membrane permeability. The results highlight the need for ongoing monitoring of resistance mechanisms to ensure the safety of personnel and the integrity of the laboratory environment.

Keywords: Laboratory environment; Multidrug-resistant microorganisms; PCR and qPCR.

¹ Autor/Apresentador – Universidade Franciscana (UFN), email: paulo.moraes@ufn.edu.br.

² Demais Autores - Universidade Franciscana (UFN). djeniferulrich@gmail.com; gabriel40097@gmail.com; gabrieliff382@gmail.com; bevilacqua.ungaratho@gmail.com; rejane.bastos@ufn.edu.br; brenda.moreira@ufn.edu.br; gerson.brum@ufn.edu.br.

Eixo Temático: Atenção Integral e Promoção à Saúde (AIPS).

1. INTRODUÇÃO

Micro-organismos multirresistentes representam uma grave ameaça à saúde pública, pois são capazes de resistir a antibióticos de última linha, como carbapenêmicos e colistina (RICE, L., 2013). O gene *blaKPC* (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) codifica uma enzima que degrada os carbapenêmicos (BUSH, K. *et al.*, 2013; (RICE, L., 2013), tornando as infecções causadas por microrganismos portadores desse gene extremamente difíceis de tratar (TOOKE, C. *et al.*, 2019). O gene *blaNDM* (New Delhi metallo-beta-lactamase) também confere resistência a carbapenêmicos e está amplamente disseminado em várias bactérias (LEE, G. *et al.*, 2016; MARTINEZ, T. *et al.*, 2016; HAGEMANN, J. *et al.* 2018) Já o gene MCR-1 (mobilized colistin resistance) proporciona resistência à colistina (GAO, R. *et al.*, 2016; LING, Z. *et al.*, 2020; SMELIKOVA, E.; TKADLEC, J.; KRUTOVA, M., 2022), um antibiótico de último recurso contra infecções multirresistentes. A disseminação desses genes é uma preocupação crescente tanto em ambientes hospitalares quanto em outros locais de assistência à saúde (FREITAS, B.; ALVES, M.; GAÍVA, M., 2020)

Para mitigar esses riscos, o monitoramento de amostras ambientais é essencial em locais que façam o diagnóstico de micro-organismos portadores desses genes de resistência (LIMA, V. *et al.*, 2022). Uma vigilância contínua é crucial para prevenir a disseminação dessas resistências e manter a integridade do ambiente (HENDERSON, J. *et al.*, 2021). Em laboratórios de análises clínicas, a higienização e desinfecção de superfícies são fundamentais para garantir a segurança dos profissionais, pois essas superfícies podem acumular microrganismos e se tornar reservatórios de proliferação microbiana (CHAVES, L. *et al.*, 2015; GOMES, S. *et al.*, 2019).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 786/2023 (2023), que regulamenta práticas para laboratórios de análises clínicas no Brasil, estabelece diretrizes para a

construção de ambientes e fluxos de trabalho que minimizam a contaminação direta e cruzada. Além disso, a norma aborda práticas de segurança e higiene, e diretrizes para o gerenciamento e descarte de resíduos, garantindo um ambiente seguro para os operadores. O controle constante do ambiente laboratorial é essencial, promovendo um espaço de trabalho seguro para todos os colaboradores.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica que permite amplificar pequenas quantidades de DNA, gerando múltiplas cópias de uma sequência específica (SIEBERT, P. *et al.*, 1995; FUJITA, T. *et al.*, 2018). Conhecida por sua alta sensibilidade e especificidade, a PCR proporciona resultados rápidos na detecção de patógenos (ZHOU, C. *et al.*, 2019). Essa técnica é amplamente utilizada em pesquisas científicas (MIRABILE, A. *et al.*, 2024) no diagnóstico de doenças (ZHOU, C. *et al.*, 2019) e como uma ferramenta valiosa no controle microbiológico (BOROWIAK, M. *et al.*, 2020). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença de microrganismos multirresistentes nas superfícies de um laboratório clínico, utilizando a técnica de PCR, com a finalidade de aprimorar as práticas de controle e segurança no ambiente laboratorial.

2. METODOLOGIA

Foram coletadas um total de 35 amostras de superfícies no laboratório, incluindo bancadas, maçanetas, microscópios, estufas, fluxo laminar, cabine de segurança biológica, teclados dos computadores entre outros. As coletas foram realizadas com swabs de algodão estéreis, previamente umedecidos em solução salina, e inoculadas em 5 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) com disco de fusão de meropenem 10 µg. As amostras foram incubadas a 37°C por 48 horas. Em seguida, foram semeadas em ágar MacConkey, um meio seletivo para bactérias gram-negativas, e incubadas novamente a 37°C por 24 horas.

Nas placas com crescimento de bactérias, as colônias isoladas foram coletadas e suspensas em 2 mL de solução salina para alcançar a turbidez correspondente à escala 2.0 de MacFarland. O DNA bacteriano foi então extraído por método de fervura, aquecendo a amostra a 100°C por 10 minutos em um banho a seco (termobloco). Após a fervura, as amostras foram centrifugadas a 9.800 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um microtubo estéril e utilizado na análise de PCR.

Para a identificação do gene *blaKPC*, a PCR foi realizada utilizando primers específicos para cada alvo (conforme Tabela 1). O mix final de 25 µL foi preparado com 2,5 µL de tampão (Ludwig), 0,90 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂), 6,25 µL de dNTPs a 0,25 mM, 0,63 µL de cada primer (forward e reverse, a 10 µM), 0,50 µL de Taq Polimerase, 11,60 µL de água ultrapura e 2 µL de DNA bacteriano. A amplificação foi conduzida no equipamento ProFlex PCR System (Applied Biosystems), com uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 15 minutos, seguida por 38 ciclos de desnaturação a 94 °C por 60 segundos, anelamento a 54 °C por 60 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, com uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,5% e analisados em um transiluminador de LED (KASVI).

Para a identificação do gene *blaNDM*, foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR) utilizando primers específicos para o gene de interesse (conforme Tabela 1). O mix final de 10 µL foi preparado com 5 µL de GoTaq® qPCR Master Mix, 0,1 µL de Supplemental CXR Reference Dye, 0,25 µL de cada primer (forward e reverse, a 10 µM), 2,40 µL de água ultrapura e 2 µL de DNA bacteriano, seguindo as instruções do kit GoTaq® qPCR Master (Promega, Madison, WI, EUA). A qPCR foi conduzida no equipamento QuantStudio 5 (Applied Biosystems), começando com uma etapa de ativação da enzima GoTaq® a 95°C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto.

Para a identificação do gene *mcr-1*, a PCR foi realizada utilizando primers específicos para cada alvo (conforme Tabela 1). O mix final de 25 µL foi preparado com 2,5 µL de tampão (Ludwig), 0,75 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂), 5 µL de dNTPs a 0,25 mM, 1,25 µL de cada primer (forward e reverse, a 10 µM), 0,50 µL de Taq Polimerase, 11,75 µL de água ultrapura e 2 µL de DNA bacteriano. A amplificação foi conduzida no equipamento ProFlex PCR System (Applied Biosystems), com uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento a 56 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos, com uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. Os produtos da PCR foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,5% e analisados em um transiluminador de LED (KASVI).

Tabela 1: Sequência de primers e tamanho dos amplicos dos alvos pesquisados.

PRIMER	SEQUÊNCIA		AMPLICON
KPC	Foward Reverse	5' ATGTCACTGTATCGCCGTCT 3' 5' TTTTCAGAGCCTTACTGCCC 3'	893 pb
MCR-1	Foward Reverse	5' AGTCCGTTTGTTCTTGTGGC 3' 5' AGATCCTTGGTCTCGGCTTG 3'	320 pb
NDM	Foward Reverse	5' TTGGCCTTGCTGTCCTTG 3' 5' ACACCATACAATATCACCG 3'	82 pb Tm: 84°C ±1°C

Sequências dos primers e tamanhos dos amplicons dos genes-alvo analisados. Pb: pares de base, Tm: temperatura de melting.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Das 35 amostras coletadas no laboratório, 15 apresentaram turbidez no caldo BHI e, posteriormente, crescimento de colônias bacterianas em ágar MacConkey (Tabela 2). A turbidez observada, mesmo na presença de meropenem, sugere um crescimento bacteriano significativo, indicando a presença de microrganismos com mecanismos de resistência avançados. O meropenem, um antibiótico de última linha eficaz contra uma ampla gama de bactérias gram-negativas, não conseguiu inibir essas bactérias, evidenciando sua notável resistência. O subsequente crescimento em ágar MacConkey confirma que essas bactérias são gram-negativas, viáveis e capazes de proliferar em condições de cultivo padrão. O próximo passo foi a extração do DNA dessas amostras, seguida pela análise por qPCR para a identificação dos genes de resistência mencionados neste estudo.

Tabela 2: Amostras que apresentaram crescimento bacteriano em ágar MacConkey após triagem.

Amostra	Superfície	Local
15	Maçaneta porta de entrada	Setor de biologia molecular - Área 3
17	Pipetas	Setor de biologia molecular - Área 3
18	Bancadas	Setor de biologia molecular - Área 3
19	Maçanetas	Sala administrativa
21	Teclado computador	Sala administrativa
23	Manipulos da autoclave	Sala da autoclave
24	Bancadas hematologia	Setor de hematologia
25	Bancadas bioquímica	Setor de bioquímica
27	Microscópio (micro e macro)	Setor de bioquímica
28	Centrifuga (botão e tampa)	Setor de bioquímica
29	Bancadas	Setor de microbiologia
31	Maçaneta estufa	Setor de microbiologia
33	Maçanetas	Entrada sala 213
34	Bancadas	Sala de esterilização
35	Manipulos da autoclave	Sala de esterilização

As amostras listadas nesta tabela apresentaram turbidez durante a triagem no caldo BHI, indicando crescimento bacteriano, mesmo na presença do meropenem. Essas amostras também demonstraram crescimento de colônias após o cultivo em ágar MacConkey

Os resultados da eletroforese em gel de agarose para a detecção do gene *mcr-1* indicaram a ausência desse gene nas amostras bacterianas analisadas. A ausência das bandas esperadas sugere que os microrganismos presentes nas amostras não carregavam o gene *mcr-1*, associado à resistência à colistina (Figura 1).

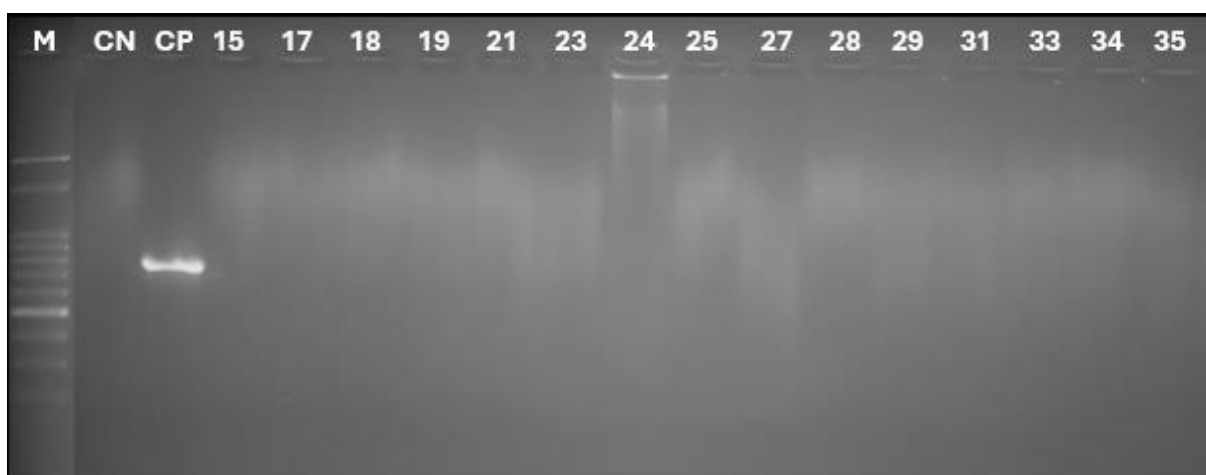
Figura 1: Eletroforese em gel de agarose da pesquisa do gene *mcr-1* em amostras bacterianas.



Eletroforese em gel de agarose de amostras bacterianas para a detecção do gene *mcr-1*. As bandas visíveis no gel correspondem à amplificação do gene *mcr-1*, enquanto a ausência de bandas indica a ausência do gene. M: corresponde ao marcador de peso molecular (1kb), CN: controle negativo, CP: controle positivo (320 pb), 15-35: amostras bacterianas.

Similarmente, a ausência de bandas para o gene *blaKPC* indica que não foram encontrados microrganismos com resistência a carbapenêmicos nas amostras analisadas. Esse gene é responsável por conferir resistência a uma classe de antibióticos de última linha e sua não detecção pode sugerir que as amostras não continham cepas produtoras de KPC (figura 2).

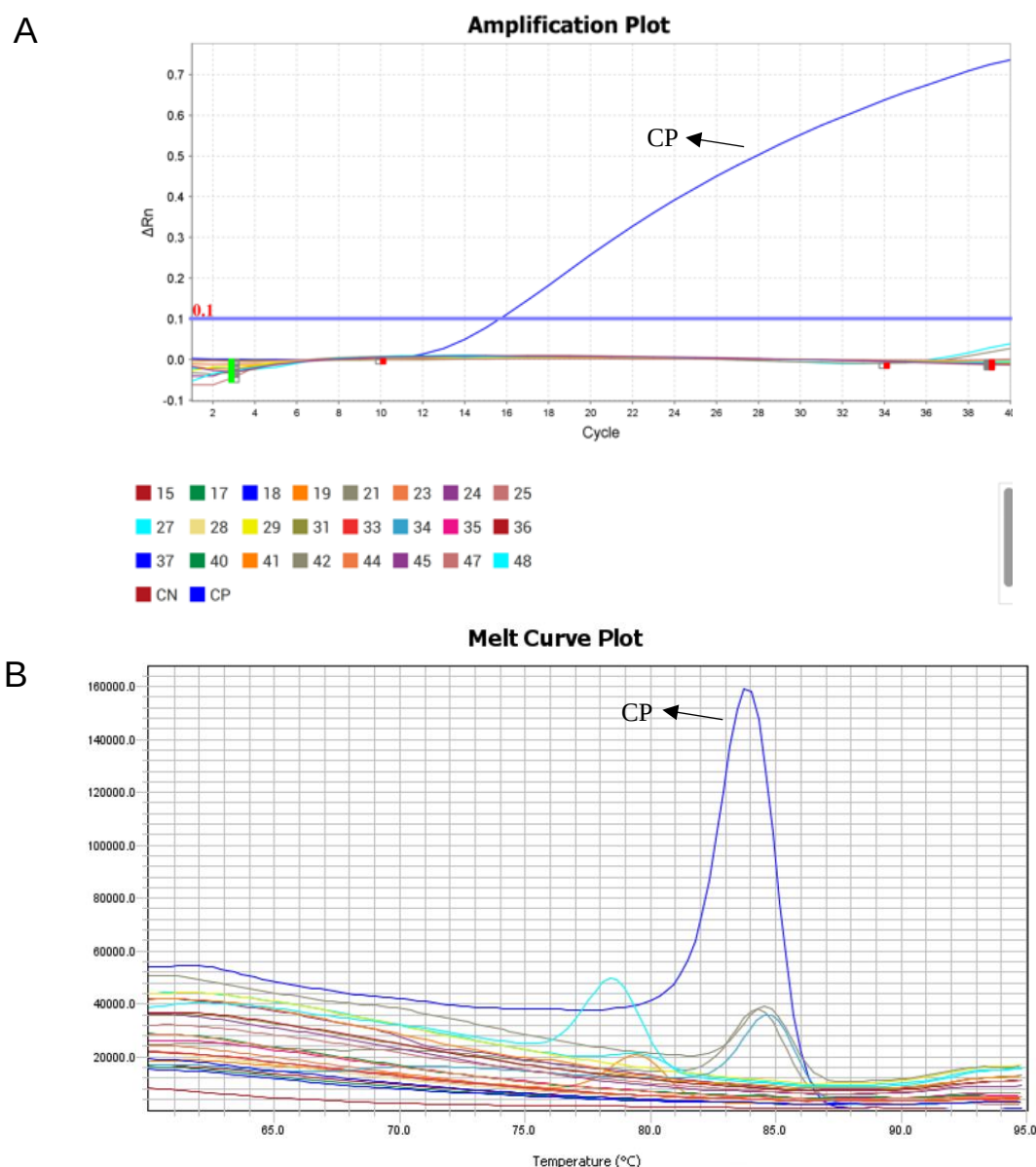
Figura 2: Eletroforese em gel de agarose da pesquisa do gene *blaKPC* em amostras bacterianas.



Eletroforese em gel de agarose de amostras bacterianas para a detecção do gene *mcr-1*. As bandas visíveis no gel correspondem à amplificação do gene *mcr-1*, enquanto a ausência de bandas indica a ausência do gene. M: corresponde ao marcador de peso molecular (1kb), CN: controle negativo, CP: controle positivo (320 pb), 15-35: amostras bacterianas.

No caso da qPCR, as curvas de amplificação para a pesquisa do gene *blaNDM* mostram que não houve amplificação do DNA para esse gene de resistência a carbapenêmicos nas amostras bacterianas analisadas (figura 3).

Figura 3: Curvas de amplificação da qPCR para detecção do gene *blaNDM* em amostras bacterianas.



A figura apresenta as curvas de amplificação e as curvas de melting obtidas na qPCR para a detecção do gene *blaNDM* em amostras bacterianas. Curvas ascendentes representam a presença do gene *blaNDM* (curva de amplificação, 3A), e o pico maior (linha azul-escuro) representa a temperatura na qual o DNA duplo-fita se dissocia, confirmando a presença do gene *blaNDM* (curva de melting, 3B). CN: controle negativo, CP: controle positivo, 15-35: amostras bacterianas.

Apesar de não ter sido possível identificar a presença dos genes de resistência *blaKPC*, *blaNDM* e *mcr-1* nas amostras analisadas, isso não exclui a possibilidade de resistência a antibióticos nas bactérias isoladas. É importante considerar que essas amostras podem portar outros genes de resistência, como *blaOXA-48* e *blaVIM*, que também são associados a resistência a carbapenêmicos. O gene *blaOXA-48* codifica uma beta-lactamase que confere resistência a carbapenêmicos, enquanto o gene *blaVIM* é uma metalo-beta-lactamase que também confere resistência a essa classe de antibióticos (WEIß et al, 2021). Além disso, a presença de bombas de efluxo e a alteração da permeabilidade da membrana celular são outros mecanismos que podem contribuir para a resistência (Neves, 2010). Portanto, a investigação de outros genes de resistência e mecanismos adicionais continua sendo crucial para uma compreensão completa do perfil de resistência das bactérias isoladas.

4. CONCLUSÃO

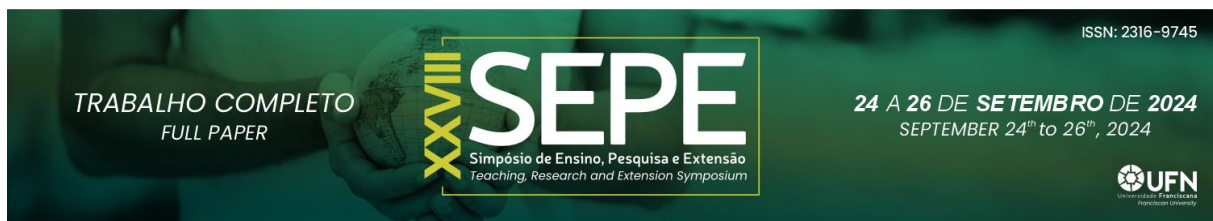
Embora não tenham sido detectados os genes *blaKPC*, *blaNDM* e *mcr-1* nas amostras bacterianas analisadas, isso não exclui a possibilidade de resistência por outros mecanismos. Portanto, a implementação de práticas robustas de controle microbiológico é essencial para assegurar a segurança dos colaboradores e a integridade do ambiente. Monitorar e gerenciar efetivamente as condições ambientais e as práticas de higienização pode prevenir a proliferação de micro-organismos resistentes, garantindo um ambiente de trabalho mais seguro e controlado.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Universidade Franciscana (UFN) pela oportunidade de realizar o trabalho no Laboratório Escola de Análises Clínicas (LEAC).

REFERÊNCIAS

BOROWIAK, Maria et al. Development of a novel *mcr-6* to *mcr-9* multiplex PCR and assessment of *mcr-1* to *mcr-9* occurrence in colistin-resistant *Salmonella enterica* isolates from environment, feed, animals and food (2011–2018) in Germany. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 80, 2020.



BUSH, Karen. The ABCD's of β -lactamase nomenclature. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 19, n. 4, p. 549-559, 2013.

CHAVES, Lucieli Dias Pedreschi et al. Governança, higiene e limpeza hospitalar: espaço de gestão do enfermeiro. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 24, p. 1166-1174, 2015.

FREITAS, Bruna Hinnah Borges Martins de; ALVES, Mayrene Dias de Sousa Moreira; GAÍVA, Maria Aparecida Munhoz. Medidas de prevenção e controle de infecção neonatal por COVID-19: revisão de escopo. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 73, p. e20200467, 2020.

FUJITA, Toshitsugu et al. Detection of genome-edited cells by oligoribonucleotide interference-PCR. **DNA Research**, v. 25, n. 4, p. 395-407, 2018.

GAO, Rongsui et al. Dissemination and mechanism for the MCR-1 colistin resistance. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 11, p. e1005957, 2016.

GOMES, Sâmea Cristina Santos et al. Acidentes de trabalho entre profissionais da limpeza hospitalar em uma capital do Nordeste, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, p. 4123-4132, 2019.

HAGEMANN, Jürgen Benjamin et al. KPC-2 carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* reaching Germany. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 7, p. 1812-1814, 2018.

HENDERSON, Julie et al. Comparing infection control and ward nurses' views of the omission of infection control activities using the Missed Nursing Care Infection Prevention and Control (MNCIPC) Survey. **Journal of nursing management**, v. 29, n. 5, p. 1228-1238, 2021.

LEE, Grace C.; BURGESS, David S. Treatment of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 11, p. 1-9, 2012.

LIMA, Vanessa Carreiro Cabral et al. A Importância do Controle das Infecções Hospitalares para Minimizar a Resistência Bacteriana. **Epitaya E-books**, v. 1, n. 20, p. 66-99, 2022.

LING, Zhuoren et al. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 11, p. 3087-3095, 2020.

MARTINEZ, Teresa et al. Genetic environment of the KPC gene in *Acinetobacter baumannii* ST2 clone from Puerto Rico and genomic insights into its drug resistance. **Journal of medical microbiology**, v. 65, n. 8, p. 784-792, 2016.

MIRABILE, Alessia et al. Advancing Pathogen Identification: The Role of Digital PCR in Enhancing Diagnostic Power in Different Settings. **Diagnostics**, v. 14, n. 15, p. 1598, 2024.

NACIONAL, I. **RESOLUÇÃO - RDC Nº 786, DE 5 DE MAIO DE 2023 - RESOLUÇÃO - RDC Nº 786, DE 5 DE MAIO DE 2023 - DOU - Imprensa Nacional**. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-786-de-5-de-maio-de-2023-482394228>>.

NEVES, P. R.. **Alterações da permeabilidade e expressão de bombas de efluxo em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao imipenem**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

RICE, Louis B. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2012. p. 198-208.



SIEBERT, Paul D. et al. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. **Nucleic acids research**, v. 23, n. 6, p. 1087, 1995.

SMELIKOVA, Eva; TKADLEC, Jan; KRUTOVA, Marcela. How to: screening for mcr-mediated resistance to colistin. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 28, n. 1, p. 43-50, 2022

TOOKE, Catherine L. et al. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **Journal of molecular biology**, v. 431, n. 18, p. 3472-3500, 2019.

WEIß, D. et al. A multiplex real-time PCR for the direct, fast, economic and simultaneous detection of the carbapenemase genes blaKPC, blaNDM, blaVIM and blaOXA-48. **Journal of microbiological methods**, v. 142, p. 20-26, 2017.

ZHOU, Chenglong et al. PCR detection for syphilis diagnosis: Status and prospects. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 33, n. 5, p. e22890, 2019.