UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DAS RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

LUANA LAMARO

Prevalência e Caracterização Molecular de Bastonetes Gram Negativos Isolados do Sistema de Transporte Público Coletivo do Município de Goiânia-GO

Goiânia
2017

sistema de bibliotecas ufg

UFG

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **[X] Dissertação** **[ ] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Luana Lamaro

Título do trabalho: Prevalência e caracterização molecular de bastonetes Gram negativos isolados do sistema de transporte público coletivo do município de Goiânia-Go

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [ ] NÃO[1]

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Luana Lamaro

Data: 17 / 09 / 2017

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

LUANA LAMARO

Prevalência e Caracterização Molecular de Bastonetes Gram Negativos Isolados do Sistema de Transporte Público Coletivo do Município de Goiânia-GO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Profª. Drª. Juliana Lamaro Cardoso

Goiânia
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Lamaro, Luana
Prevalência e caracterização molecular de bastonetes Gram negativos isolados do sistema de transporte público coletivo do município de Goiânia-Go [manuscrito] / Luana Lamaro. - 2017.
17, 116 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Juliana Lamaro Cardoso.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, , Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito Hospedeiro, Goiânia, 2017.
Bibliografia. Anexos.
Inclui abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Clusters. 2. Contaminação. 3. Disseminação. 4. Fômites. 5. Ônibus. I. Lamaro Cardoso, Juliana , orient. II. Título.

CDU 561.23

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO
Rua 235, s/n – Setor Universitário - Goiânia/GO – CEP: 74.605-050
Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 – Fax: (62) 3209.6363 – **e-mail : ppgbrph@gmail.com**

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE LUANA LAMARO - Aos nove dias do mês de junho do ano de 2017 (09/06/2017), às 14:30 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profas. Dras. JULIANA LAMARO CARDOSO, MARIA CLÁUDIA DANTAS PORFIRIO BORGES ANDRÉ e ALESSANDRA MARQUES CARDOSO, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **"PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BASTONETES GRAM NEGATIVOS ISOLADOS DO SISTEMA DE TRANSPORTE PÚBLICO COLETIVO DO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA-GO"**, em nível de **MESTRADO**, de autoria de **LUANA LAMARO**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. JULIANA LAMARO CARDOSO, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1406/2016 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora	**Aprovada / Reprovada**
Profa. Dra. Juliana Lamaro Cardoso	Aprovada
Profa. Dra. Maria Cláudia Dantas Porfirio Borges André	Aprovada
Profa. Dra. Alessandra Marques Cardoso	Aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata habilitada, (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17 h 00 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, JOSÉ CLEMENTINO DE OLIVEIRA NETO, secretário do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

_____

_____

_____

_____

	Assinatura
Profa. Dra. Juliana Lamaro Cardoso (IPTSP/UFG)	Cardoso
Profa. Dra. Maria Cláudia Dantas Porfirio Borges André (IPTSP/UFG)	Maria Cláudia D. P. B. André
Profa. Dra. Alessandra Marques Cardoso (PUC/GO)	Alessandra Marques Cardoso.
Secretário da Pós-Graduação:	

Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): LUANA LAMARO

Orientador (a): Profª. Drª. JULIANA LAMARO CARDOSO

Membros:

1.Profª. Drª. JULIANA LAMARO CARDOSO

2.Profª. Drª. MARIA CLÁUDIA DANTAS PORFÍRIO BORGES ANDRÉ

3. Profª. Drª ALESSANDRA MARQUES CARDOSO

Data:09/06/2017

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade em realizar o mestrado, por me proporcionar saúde, sabedoria e pelos bons momentos vividos durante essa etapa.

À orientadora, Profª. Drª. Juliana Lamaro Cardoso, pela orientação e dedicação, pela paciência em ensinar, por compartilhar o conhecimento, pela confiança e por me motivar a fazer sempre um bom trabalho. À você, toda minha admiração profissional e pessoal.

À Profª. Drª. Maria Cláudia Dantas P. B. André pelo acompanhamento durante esses anos de mestrado, pelas contribuições para o meu crescimento profissional, por toda ajuda prestada, sempre com muita dedicação.

Aos professores, em especial, Profª. Drª. Maria Das Graças Cabral Pereira, Profª. Drª. Lilian Carla Carneiro e Prof. Dr. André Kipnis, sempre disponíveis e dispostos a solucionar dúvidas e problemas que surgiram ao longo da realização deste trabalho.

Aos técnicos Nathalia e Sr. Aristides, por todo suporte prestado, pelo companheirismo, pela amizade, pelas conversas nas horas vagas.

À UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS por prezar pela qualidade do ensino mesmo em momentos difíceis.

À coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À RMTC e a METROBUS pelo apoio prestado e por permitir que as coletas fossem realizadas em horários flexíveis, dando liberdade e dinamismo para a pesquisa.

Aos colegas e amigos do laboratório de bacteriologia Cyndi, Jessica, Lorrane, Tainá, por compartilharem o conhecimento adquirido no laboratório, pela boa convivência, pela amizade, pelos bons momentos dentro e fora do laboratório, pela ajuda durante a execução do trabalho. Um agradecimento especial a Robmary, grande companheira de trabalho, pelas nossas trocas de experiências profissionais e pessoais, pelos conselhos. Muito obrigada por ter sido meu ombro amigo durante o mestrado.

Aos estagiários e amigos do laboratório Milaine, Raul, Paulo, pelo interesse em aprender, por me ajudarem no momento mais crítico do meu trabalho, por serem sempre prestativos, amigos e pacientes. Um agradecimento especial à Barbara, sempre se mostrou muito amiga e companheira para todos os momentos. Obrigada pelas ótimas conversas e risadas.

Ao meu pai, José Antônio Lamaro, por dedicar sua vida a mim, por acreditar que sou capaz de atingir todos os meus objetivos, por sempre me incentivar a estudar, por me apoiar, por ser minha maior torcida. À minha mãe, Emília Dias Braga Lamaro (*in memoriam*), agradeço pela vida e por guiar os meus passos.

Ao meu irmão, José Lamaro Neto e à minha cunhada, Renata Brites Teixeira Lamaro, por serem meus grandes companheiros, por acompanharem e apoiarem o meu crescimento profissional e por estarem sempre presentes na minha vida.

À minha família, tios, tias, primos, primas, à minha avó, por compreenderem minha ausência nesses últimos anos e torcerem pelo meu sucesso profissional. Agradeço todo o carinho e acolhimento de vocês.

Ao meu noivo, Saulo Humberto de Ávila Filho, por caminhar ao meu lado, por ser meu esteio, por me incentivar, pela ajuda na parte intelectual e

emocional, por torcer comigo cada etapa concluída durante minha vida. Ao meu sogro, Saulo Humberto de Ávila, e minha sogra, Edilza Portela Silva de Ávila, pelo incentivo, pelo carinho e por serem participativos em minha vida.

A todos vocês, muito obrigada!

Luana Lamaro

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....x
LISTA DE QUADROS.....xi
LISTA DE FIGURAS.....xii
ANEXOS.....xiv
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....xv
RESUMO xvii
ABSTRACT xviii
1 INTRODUÇÃO..... 1
2 REVISÃO DA LITERATURA..... 3
2.1 FÔMITES 3
2.1.1 Relação entre fômites e disseminação bacteriana..... 6
2.1.1.1 Fômites em instituições de saúde 6
2.1.1.2 Fômites em ambientes domésticos..... 9
2.1.1.3 Fômites em ambientes comunitários..... 10
2.1.1.4 Fômites em transportes coletivos urbanos..... 11
2.2 BACILOS GRAM NEGATIVOS 12
2.2.1 Família *Enterobacteriaceae*..... 13
2.2.2 Bastonetes Gram Negativos Não Fermentadores..... 15
2.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS 16
2.3.1 Enzimas betalactamases..... 17
2.3.2 Resistência mediada por AmpC..... 19
2.3.4 Enzimas carbapenemases..... 20
3 JUSTIFICATIVA 23
4 OBJETIVOS..... 25
4.1 OBJETIVO GERAL 25
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 25
5 MÉTODOS..... 26
5.1 AMOSTRAGEM 26
5.2 COLETA DAS AMOSTRAS 27
5.3 PROCEDIMENTOS MICROBIOLÓGICOS 27
5.4 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO..... 28
5.5 PCRMULTIPLEX PARA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE INTERESSE..... 28
5.6 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS..... 31
5.6.1 Método de Disco Difusão 31

5.6.2 Detecção fenotípica de resistência aos antimicrobianos betalactamicos 33
5.7 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL 34
5.8 PCR CONVENCIONAL PARA DETECÇÃO DOS GENES QUE CONFEREM RESISTÊNCIA AOS AGENTES BETALACTÂMICOS 34
5.9 ELETROFORESE EM GEL EM CAMPO PULSADO (PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS – PFGE) 36
5.10 ANÁLISE DE DADOS 38
6 RESULTADOS 39
6.1 PREVALÊNCIA DE CONTAMINAÇÃO DA LINHA LESTE-OESTE POR BACILOS GRAM NEGATIVOS 39
6.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR mPCR 41
6.3 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS 44
6.4 GENES BETALACTAMASES 51
6.5 PULSED FIELD GEL ELECTROFORESE 52
8 CONCLUSÕES 68
REFERÊNCIAS 69
ANEXOS 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Prevalência de contaminação por bacilos Gram negativos, coletados das barras fixas horizontais e verticais dos ônibus em circulação e das catracas das plataformas e terminais presentes em toda a extensão sistema de transporte público coletivo da Linha Leste-Oeste, no município de Goiânia – GO 40

Tabela 2: Espécies de BGN identificadas pela técnica PCRm provenientes das barras fixas horizontais e verticais dos ônibus e das catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo Leste-Oeste, no município de Goiânia – GO 41

Tabela 3: Perfil de suscetibilidade dos *A. baumannii* isolados das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e nas catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo Leste-Oeste, no município de Goiânia – GO 46

Tabela 4: Perfil de suscetibilidade dos *P. mirabilis* isolados das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e nas catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo Leste-Oeste, no município de Goiânia – GO 47

Tabela 5: Perfil de suscetibilidade das *E. coli* isoladas das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e nas catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo Leste-Oeste, no município de Goiânia – GO 48

Tabela 6: Perfil de suscetibilidade das *H. alvei* isoladas das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e nas catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo Leste-Oeste, no município de Goiânia – GO 49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Relação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCRm para a identificação das espécies de interesse isoladas do sistema de transporte público de Goiânia-GO..... 29

Quadro 2: Relação dos antimicrobianos testados para cada espécie identificada para a realização do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. 32

Quadro 3: Relação dos oligonucelotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para a detecção de genes de betalactamases. 35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa completo da linha Leste-Oeste, do município de Goiânia, GO. 26

Figura 2: Coloração de Gram dos bacilos Gram negativos isolados das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e catracas de entrada e saída das plataformas e terminais de integração da linha Leste-Oeste do município de Goiânia-GO. 39

Figura 3: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCRm para detecção da espécie *A. baumannii* nos isolados das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e nas catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo Leste-Oeste, no município de Goiânia – GO. C+: *A. baumannii* (CCT 1432) – 190 pb; colunas 1 a 9 e 11 a 13: amostras positivas; coluna 10: amostra negativa; C-: controle negativo da reação. Seta amarela: marcador de peso molecular 50 pb..... 42

Figura 4: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR para detecção da espécie *H. alvei* isolados das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e nas catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo Leste-Oeste, no município de Goiânia – GO. C+: *H. alvei* (ATCC 13337) – 393 pb; colunas 1 a 13: amostras positivas; C-: controle negativo da reação. Ponta da seta amarela: marcador de peso molecular 50 pb..... 43

Figura 5: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da mPCR para detecção da espécie *P. mirabilis* isolados das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e nas catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo Leste-Oeste, no município de Goiânia – GO. C+: *P. mirabilis* (LACEN - GO) - 458 pb; colunas 9 e 12: amostras positivas; colunas 1 a 8, 10, 11 e 13: amostras negativas; C-: controle negativo da reação. Seta amarela: marcador de peso molecular de 50 pb... 43

Figura 6: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da mPCR para detecção da espécie *E. coli* isolados das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e nas catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo Leste-Oeste, no município de Goiânia – GO. C+: *E. coli* (ATCC 25922) – 101 pb; colunas 1 e 2, 5 a 8, 10, 11 e 13: amostras positivas; colunas 3 e 4, 9 e 12: amostras negativas; C-: controle negativo da reação. Seta amarela: marcador de peso molecular de 50 pb.10..... 44

Figura 7: Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos realizado pelo método de disco de difusão com BGN isolados das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e nas catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo Leste-Oeste, no município de Goiânia – GO. A: *H. alvei* apresentando sensibilidade aos antimicrobianos testados. B: *P. mirabilis* com apresentando resistência a várias classes dos antimicrobianos testados. 45

Figura 8: Detecção fenotípica da resistência aos antimicrobianos betalactâmicos. A: resultado negativo da indução do gene *bla*$_{AmpC}$. B: resultado negativo da produção de ESBL. C: resultado negativo do THM; Setas vermelhas: estrias verticais com isolado suspeito de produzir carbapenemase; Setas amarelas: estrias horizontais com o controle positivo de *K. pneumoniae* ATCC BAA 17005. 50

Figura 9: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR para detecção do gene *bla*$_{CTX}$ no DNA plasmidial dos isolados resistentes aos agentes betalactâmicos. Colunas 5, 6 e 11: amostras positivas; colunas 1 – 4; 7 – 10; 12 e 13: amostras negativas; C+: controle positivo (189 pb); C-: controle negativo da reação. Ponta da seta amarela: marcador de peso molecular de 50 pb..... 50

Figura 10: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR para detecção do gene *bla*$_{TEM}$ no DNA plasmidial dos isolados resistentes aos agentes betalactâmicos. Colunas 6 e 7: amostras positivas; colunas 1 – 5; 8 – 10: amostras negativas; C+: controle positivo (165 pb); C-: controle negativo da reação. Ponta da seta amarela: marcador de peso molecular de 50 pb. 51

Figura 11 A: Dendrograma resultante da análise da comparação dos perfils de restrição dos *P. miraiblis* isolados das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e nas catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo no município de Goiânia – Go. A, C, D, E, F: *clusters;* 1 e 2: clones. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 11 B: Dendrograma resultante da análise da comparação dos perfils de restrição dos *P. miraiblis* isolados das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e nas catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo no município de Goiânia – Go. B, G, H: *clusters;* 3: clone. ..... 5**Erro! Indicador não definido.**

ANEXOS

Anexo 01: Autorização emitida pelas empresas RMTC e Metrobus, permitindo que as coletas fossem realizadas em todos os ônibus, terminais e plataformas da linha Leste-Oeste do município de Goiânia.....91

Anexo 02: Quadro referente as datas de coletas realizadas nas linhas dos ônibus, plataformas e terminais da linha Leste-Oeste, Goiânia – GO.....92

Anexo 03: Molecular Epidemiology of Gram-negative rods from the Collective Public Transport System in the Central Region of Brazil……..…93

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – *American Type Culture Collection*

BGN – Bacilos Gram Negativos

BGNMDR – Bacilos Gram Negativos Multidroga Resistentes

BGNNF – Bacilos Gram Negativos Não Fermentadores

BHI – *Brain Heart Infusion*

BM – Banho Maria

CCT – Coleção de Culturas Tropicais

CDC – *Center for Disease Control and Prevention*

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

EPI – Equipamento de Proteção Individual

ESBL – Extended-spectrum Beta-lactamases

MBL – Metalo Betalactamase

MDR – Multidroga Resistente

NDM1 – *New Delhi Metallo-betalactamase*

PFGE – Pulsed Field Gel Electrophoresis

RMTC – Rede Metropolitana de Tranporte Coletivo

THM – Teste de Hodge Modificado

TSA – Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

TSB – *Triptic Soy Broth*

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

RESUMO

Objetos contaminados por micro-organismos são denominados fômites. Vários estudos relacionam fômites como fontes de disseminação de micro-organismos. Este estudo objetivou isolar e identificar Bastonetes Gram Negativos (BGN) de uma linha de transporte público coletivo da cidade de Goiânia – GO, caracterizar por métodos fenotípicos e genotípicos o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e analisar o perfil de macrorrestrição dos isolados. As amostras das superfícies das barras fixas dos ônibus e as catracas das plataformas e terminais da linha Leste-Oeste foram coletadas com *swab* e enviadas para o Laboratório de Bacteriologia Aplicada do IPTSP-UFG. Após o cultivo dos BGN, as espécies foram identificadas por PCR e submetidas ao Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA). O DNA plasmidial das cepas resistentes aos betalactâmicos foi extraído para a pesquisa dos genes codificadores de betalactamases por PCR. O perfil de macrorrestrição das cepas de *P. mirabilis* foi realizado por PFGE utilizando a enzima *XbaI*. Foram coletados 852 swabs representando uma prevalência de 46,0% de BGN nas superfícies avaliadas. As espécies identificadas foram: *A. baumannii* (40,8 %)*, H. alvei* (30,9 %), *P. mirabilis* (26,1 %) *e E. coli* (2,2 %). O TSA revelou 31 (7,9 %) isolados multidroga resistentes. Foram detectados os genes bla_{TEM} e o gene bla_{CTX}. Observamos a presença de oito *clusters* e três clones entre as espécies *P. mirabilis*. Este estudo comprova que as superfícies presentes no sistema de transporte público coletivo podem ser fontes de BGN multidroga resistentes e que essas bactérias possuem potencial de dispersar e permanecer em diferentes ambientes comunitários.

Palavras – chave: *clusters,* contaminação, disseminação, fômites, ônibus

ABSTRACT

Objects contaminated with microorganisms are denominated fomites. A number of studies have reported fomites as sources of microorganism dissemination. This study aimed to isolate and identify Gram Negative Bacilli (GNB) from a collective public transport line in the city of Goiânia, GO, to characterize by phenotypic and genotypic methods in the antimicrobial susceptibility profile and to analyze the macrorrestricity profile of the isolated. As samples of the fixed bars surfaces of the buses and ratchets of the platforms and terminals of “Leste-Oeste” line were collected with swab and sent to the Laboratory of Applied Bacteriology of the IPTSP-UFG. After the GNB culture, as species were identified by PCR and submitted to the Antimicrobial Susceptibility Test (AST). The plasmid DNA of the strains resistant to beta-lactams was extracted for the search of genes encoding beta-lactamases by PCR. The macrorrestriction profile of *P. mirabilis* strains was performed by PFGE using the *XbaI* enzyme. A total of 852 swabs were collected representing a prevalence of 46.0% of GNB in the evaluated surfaces. The species identified were *A. baumannii* (40.8%), *H. alvei* (30.9%), *P. mirabilis* (26.1%) and *E. coli* (2.2%). The AST revealed 31 (7.9%) multidrug resistant isolates. The bla_{TEM} and bla_{CTX} genes were detected. We observed a presence of eight clusters and three clones among the species *P. mirabilis*. This study proves that the surfaces present in the collective public transport system can be sources of resistant multi-drug GNB and these bacteria have the potential of dispersion and permanence in different community environments.

Keywords: bus, *clusters,* contamination, dissemination, fomites

1 INTRODUÇÃO

Durante muitos anos acreditava-se que os micro-organismos eram transmitidos diretamente pelo ar ou por contato direto com pessoas infectadas, sendo consideradas as principais vias de disseminação de micro-organismos causadores de doenças infecciosas (Goldmann 2000; Cozad et al. 2003). Porém, no final dos anos 80 e início dos anos 90, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) passou a considerar o papel das superfícies inanimadas na transmissão de micro-organismos patogênicos (CDC 1996).

A partir desse momento ocorreram mudanças na perspectiva de transmissão de micro-organismos, considerando-a mais complexa e multifatorial, uma vez que passou a valorizar as superfícies do ambiente circundante como potencial transmissor de micro-organismos (Goldmann 2000).

Os mecanismos de transmissão de micro-organismos estão bem definidos e podem ser classificados como transmissão direta ou indireta. A transmissão direta de micro-organismos engloba o contato direto com secreções corporais contaminadas de outros indivíduos, por exemplo, sangue, urina, fezes, secreção nasal ou a contaminação com a microbiota endógena. Ainda estão inclusas a transmissão de micro-organismos pelo ar, vento, poeira e transmissão por animais vetores, principalmente os insetos. A transmissão indireta, por sua vez, envolve o contato com objetos contaminados, principalmente através das mãos (Goldmann 2000).

Atualmente, é crescente as evidências sobre a função dos fômites na disseminação de patógenos infecciosos (Springthorpe & Sattar 1990; Aitken & Jeffroes 2001; Barker 2001; Hota 2004; Ulger et al. 2015; Russotto et al. 2015; Rao et al. 2017). Vários estudos evidenciaram a presença de fômites em diversos ambientes, principalmente em instituições de saúde e dentro dos ambientes domésticos. Nas instituições de saúde, os objetos mais estudados são aqueles veiculados principalmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), a exemplo, jalecos (Munoz-Price et al. 2012), luvas (Ye et al. 2015), estetoscópios (Whittington et al. 2009), esfigmomanômetros (Matsuo & Furukawa 2013) monitores cardíacos (Huslage et al. 2010), entre outros.

Em relação ao ambiente doméstico é admitido que o banheiro e a cozinha são as grandes fontes de disseminação de micro-organismos. Os principais patógenos encontrados nesses ambientes são os bacilos Gram negativos causadores de gastroenterites e o *Staphylococcus aureus* (Bloomfield et al. 2007; Sinclair & Gerba 2011; Medrano-Félix et al. 2011; Bloomfield et al. 2012).

Alguns estudos também são realizados em áreas públicas ou com objetos cotidianos. Dentre eles, já foram observados fômites presentes em creches (Boone & Gerba 2007), escritórios (Boone & Gerba 2010), escolas (Bright et al. 2010), micro-organismos retidos em dinheiro (Angelakis et al. 2014), veículos de emergência médica (Eibitch & Vogel 2011) e nos componentes dos transportes públicos coletivos, como ônibus, metrôs (Rodrigues et al. 2006; Yeh et al. 2011; Iwao et al. 2012; Lutz et al. 2014) e trêns (Otter & French 2011).

No Brasil existem poucos dados sobre fômites presentes nos sistemas de transportes públicos coletivos, principalmente estudos que evidenciam a presença dos bacilos Gram negativos nesses transportes (Rodrigues et al. 2006). Essas informações poderiam auxiliar na redução da disseminação de micro-organismos, principalmente os patogênicos, além de fornecer bases epidemiológicas para monitoração e controle dos mesmos (Nicas & Sun 2006).

2 REVISÃO DA LITERATURA

Uma vez que as superfícies ambientais e objetos contaminados por bactérias passaram a ser alvos de pesquisas, principalmente em ambientes hospitalares ou aqueles relacionados a surtos alimentares, a atenção ao tema ganhou dimensão em âmbito comunitário, resultando em uma visão mais ampla dos micro-organismos infecciosos circulando na população e como eles podem ser transmitidos (Bloomfield et al. 2007).

O contato com objetos e superfícies contaminados por bactérias não necessariamente representa riscos à saúde. O desencadeamento de infecção depende de fatores como a virulência da espécie contaminante, ou seja, capacidade que as bactérias possuem de multiplicar e prejudicar o organismo; carga microbiana e da integridade imunológica do indivíduo (Gerhardts et al. 2012).

É crescente o número de pessoas com sistema imunológico debilitado na comunidade. Esse grupo é representado por idosos, pessoas com doenças crônicas e degenerativas, transplantados, hemodialisados, pessoas com utilização de dispositivos permanentes ou que realizam tratamento médico domiciliar. O aumento do grupo “de risco” na comunidade demonstra a necessidade de caracterização dos objetos e superfícies do ambiente como fômites e a importância de compreender a múltipla rota de disseminação de bactérias (Bloomfield et al. 2007).

2.1 FÔMITES

Superfícies de ambientes e objetos quando contaminados por micro-organismos, tais como bactérias, vírus e fungos, são denominados fômites. Esses micro-organismos são capazes de sobreviver nos fômites e assim serem transmitidos aos seres vivos através do contato. Portanto, os fômites podem ser considerados fonte de disseminação de micro-organismos para os seres humanos (Nicas & Sun 2006; Gerba & Pepper 2009).

A contaminação dos fômites por micro-organismos possui origem bastante diversificada. Podem ser contaminados pelos micro-organismos presentes na água, solo, vento, poeira (Huijber et al. 2015). Contudo, as mãos são consideradas as principais vias de transmissão de microrganismos e contaminação dos fômites, pois contém uma microbiota bastante variada quantitativamente e qualitativamente que pode ser transmitida aos fômites por contato (Gerba & Pepper 2009). Adicionalmente, micro-organismos presentes nos líquidos corporais, por exemplo, saliva, muco, secreção nasal, sangue, urina e fezes também podem ser transmitidos de maneira direta aos fômites (Baker et al. 2004).

Por sua vez, os micro-organismos presentes nos fômites podem contaminar os indivíduos através do contato com as portas de entrada do organismo, a exemplo, mucosa oral, nasal e ocular. Porém, o contato com os fômites através das mãos representam a principal via de aquisição de micro-organismos (Nicas & Sun 2006). Tais processos de transferência de micro-organismos resultam em contaminação cruzada e sustentam a cadeia de transmissão de micro-organismos entre pessoas e fômites (Kramer et al. 2006).

A transmissão de micro-organismos entre pessoas e fômites pode ser influenciada por alguns fatores. A natureza dos fômites influencia no sucesso da disseminação, uma vez que materiais não porosos, como o aço, vidro, ferro, são mais eficientes em expor e transmitir os micro-organismos, enquanto que as superfícies porosas, como algodão, poliéster, esponjas, papel moeda, podem retê-los em criptas dificultando sua transmissão (Lopez et al. 2013). Ainda pode estar relacionada com as práticas de desinfecção, tendo em vista que a falta ou falha na higienização dos fômites, aumenta a carga microbiana e consequentemente as chances de contaminação cruzada (Julian et al. 2013).

Outro fator influente na disseminação de micro-organismos entre pessoas e fômites são as condições ambientais. Umidade do ar acima de 70,0% representa maior chance de transmissão, pois previnem o ressecamento do micro-organismo tornando viável sua sobrevivência (Lopez et al. 2013).

A chance de transmissão de micro-organismo para os seres humanos via fômites depende também da carga microbiana, da espécie do micro-organismo e da habilidade que o micro-organismo possui em se manter viável nessa superfície (Cozad & Jones 2003; Boone & Gerba 2010). Em relação a

viabilidade dos micro-organismos em superfícies, as bactérias merecem destaque quanto à habilidade de aderência nos diferentes materiais devido à plasticidade metabólica e à formação de biofilme (Kramer et al. 2006).

O biofilme constitui uma comunidade multicelular complexa, circundada por uma matriz extracelular composta por proteínas e polissacarídeos ligando as células bacterianas (Stoodley et al. 2002). Alguns estudos sugerem que o biofilme promove proteção bacteriana, favorece a sobrevivência da bactéria sob condições ambientais adversas, previne o ressecamento do organismo em baixa umidade do ar e dificulta a entrada de biocidas (desinfetantes e antissépticos) na matriz. Portanto, esse comportamento auxilia na disseminação de micro-organismos no ambiente, pois contribui para a adesão das células nas superfícies dos fômites (Hall-Stoodley et al. 2004; Lee et al. 2008; Lewis 2010; Marks et al. 2014; Esteves et al. 2015).

De maneira geral, a maioria das bactérias é capaz de crescer e sobreviver em diversos fômites. A persistência bacteriana em fômites tem impulsionado vários autores a avaliar a viabilidade de diversas espécies em diferentes condições ambientais. Almeja-se a compreensão sobre a persistência das bactérias em fômites para auxiliar nas medidas de controle de disseminação desses micro-organismos (Kramer et al. 2006). Já foi descrito que a maioria das bactérias Gram positivas como *Enterococcus spp.* e *Streptococcus pyogenes* conseguem sobreviver durante meses em superfícies secas, e que o *S. aureus* é a espécie com maior persistência em objetos e superfícies, onde pode residir por aproximadamente sete meses (Bale et al. 1993; Noskin et al. 1995; Wendt et al. 1998; Neely & Maley 2000).

Muitas espécies de bactérias Gram negativas podem sobreviver em superfícies inanimadas durante dias a meses (Kramer et al. 2006). A exemplo, as espécies *Bordetella pertussis, Haemophilus influenzae, Proteus vulgaris* e *Vibrio cholerae*, sobrevivem por aproximadamente sete dias. No entanto, as espécies, *Serratia marcescens* podem sobreviver por dois meses, *Shigella spp.* por cinco meses, *Escherichia coli* durante seis meses, *Pseudomonas aeruginosa* por até 16 meses e *Klebsiella spp.* por 30 meses (Mitscherlich & Marth 1984; Webster et al. 2000; Panagea et al. 2005).

2.1.1 Relação entre fômites e disseminação bacteriana

A disseminação de bactérias pelo contato entre pessoas e fômites é frequentemente mostrada em estudos epidemiológicos que correlacionam a contaminação às instituições de saúde e ambientes domésticos ou comunitários (Bloomfield et al. 2012; Angelakis et al. 2014).

2.1.1.1 Fômites em instituições de saúde

Aproximadamente 40,0 % das infecções associadas à assistência à saúde podem ser atribuídas às contaminações cruzadas (Weber et al. 2010). As contaminações cruzadas acontecem principalmente a partir de mãos contaminadas dos profissionais de saúde e dos visitantes ou acompanhantes de pacientes, transmitindo micro-organismos às superfícies presentes nas instituições de saúde e assim facilitando a contaminação dos pacientes (Kramer et al. 2006).

Vários estudos evidenciaram a presença de bactérias colonizando superfícies e objetos presentes no ambiente hospitalar. Os estudos envolvem principalmente fômites que são frequentemente tocados por profissionais da saúde ou aqueles que estão em contato direto com o paciente (Boyce 2007; Ulger et al. 2009; Huslage et al.2010; Eibitch & Vogel, 2011; Banu et al., 2012; Nwankwo 2012; Rao et al. 2017). Por exemplo, fios de eletrocardiograma são posicionados em contato direto com a pele de pacientes e podem também estar próximo a feridas, curativos cirúrgicos, ponto de inserção de cateter intravenoso, entre outras injúrias. Alguns autores isolaram as espécies *Enterococcus spp*. e *P. aeruginosa* contaminando esse equipamento médico (Brown 2011; Lestari et al. 2013).

Outro equipamento bastante estudado quanto a contaminação por bactérias são os aparelhos de ventilação mecânica. Sui e colaboradores (2015) concluíram que mais de 70,6 % das superfícies do sistema de ventilação mecânica pesquisados em uma UTI estavam contaminados por *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Foi encontrado também, em outro estudo, uma diversidade de bacilos Gram negativos colonizando equipamentos portáteis de radiografia, dentre as bactérias isoladas, foram identificadas *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*.

Rao e colaboradores (2017) verificaram a presença de *S. aureus* resistentes à meticilina (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* – MRSA) e *E. coli* resistentes à ampicilina contaminando a superfície de estetoscópios. Os autores acreditam que esse instrumento médico pode favorecer a disseminação de bactérias entre pacientes, principalmente por estar em contato com a pele dos pacientes e, também, pelas práticas de desinfecção insuficientes.

Nwankwo (2012) investigou a presença de bactérias patogênicas contaminando fômites presentes em salas cirúrgicas. Dentre os fômites analisados, foi observada a presença de *E. coli* e *Salmonella* Choleraesius contaminando o chão da sala cirúrgica, *Proteus mirabilis* na cuba da pia, *Enterococcus faecalis, P. mirabilis* e *P. aeruginosa* contaminando tubos de sucção e na maca cirúrgica foram isoladas as espécies *E. coli*, *Proteus spp*., *Pseudomonas putida* e *Streptococcus spp*. Os isolados identificados ainda foram caracterizados quanto ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, o que revelou algumas cepas multidroga resistentes, principalmente dentre os bacilos Gram negativos e *S. aureus*.

Esses estudos demonstram que os equipamentos presentes em instituições de saúde, principalmente em UTI, são importantes fontes de bactérias patogênicas e podem auxiliar na disseminação de micro-organismos entre pacientes e profissionais da saúde. Outros estudos são realizados com fômites não médicos, mas que também estão presentes em instituições de saúde e por isso podem estar contaminados por bactérias e contribuir com a disseminação de microrganismos patogênicos, tanto no ambiente hospitalar, quanto comunitário, por exemplo, celulares e os Equipamentos de Proteção Individual (EPI) (Ulger et al. 2009; Morgan et al. 2010; Banu et al., 2012).

Ulger e colaboradores (2009), realizaram uma pesquisa sobre contaminação bacteriana a partir de coletas em superfícies de celulares e também nas mãos dos portadores desse dispositivo. Nesse estudo, os autores evidenciaram elevada contaminação por bactérias patogênicas, sendo que 94,5% dos celulares analisados estavam contaminados por bactérias. Foram isolados *S. aureus* em 52,0 % dos celulares, bacilos Gram negativos em 31,3 % e dentre esses, foram observadas cepas com resistência à ceftazidima. As mesmas espécies encontradas nas superfícies dos celulares também foram isoladas nas mãos dos usuários dos dispositivos, porém não foi realizada à

similaridade genética entre cepas presentes nas mãos e na superfície dos celulares.

Alguns estudos também relacionam os EPI como possíveis fômites. Morgan e colaboradores (2010) investigaram se pacientes colonizados por *A. baumannii* Multidroga Resistente (MDR) poderiam transferi-lo para as luvas utilizadas pela equipe médica de um hospital. Os autores observaram que 38,7 % das luvas tornaram-se contaminadas por *A. baumannii* MDR após prestar assistência à pacientes previamente colonizados. Observaram também que após a retirada das luvas, 4,5 % das mãos dos profissionais adquiriram a bactéria. Ainda foi avaliada a similaridade genética entre as cepas presentes nas mãos dos profissionais e nas luvas, concluindo que todas as cepas analisadas eram geneticamente idênticas.

Em outra pesquisa sobre EPI como fômites, foi feita uma avaliação da contaminação bacteriana em 100 jalecos utilizados por alunos de medicina em um hospital escola. Nesse estudo, foram isoladas bactérias patogênicas como *S. aureus* (64,7 %) e *P. aeruginosa* (4,4 %). Os autores ainda aplicaram questionários aos estudantes, para verificar a percepção deles sobre se os jalecos são ou não veiculadores de micro-organismos patogênicos. Com os questionários, concluíram que 91,0 % dos estudantes acreditam que os jalecos podem transmitir patógenos. Porém, 72,9 % dos estudantes levam seus jalecos sujos para as suas residências, além disso, 18,0 % dos estudantes afirmaram utilizar os jalecos fora das atividades médicas, como em bibliotecas, cantinas e salas de aulas. Essa perspectiva é preocupante, pois pode auxiliar na disseminação de micro-organismos patogênicos para a comunidade (Banu et al. 2012).

Portanto, com esse estudo, evidencia-se que tal equipamento de proteção individual utilizado por profissionais em instituições de saúde pode representar uma fonte de transmissão bacteriana, tanto dentro das instituições de saúde, quanto para outros ambientes comunitários e residências.

Adicionalmente, outro estudo revela a possível disseminação de bactérias do ambiente hospitalar para a comunidade. Eibitch & Vogel (2011) conduziram uma pesquisa para mostrar a contaminação por *S. aureus* nas superfícies presentes no interior de veículos de emergência médica na Alemanha. Nesse estudo, após as ambulâncias realizarem o transporte de

pacientes colonizados por MRSA, as superfícies presentes no interior das cabines eram coletadas por *swab* para avaliar a presença de MRSA. Os autores observaram que após o transporte de pacientes colonizados, 11,1 % das cabines analisadas estavam contaminadas por MRSA.

2.1.1.2 Fômites em ambientes domésticos

Em ambiente doméstico é admitido que a maioria das contaminações por micro-organismos são adquiridas por fômites presentes em banheiros e cozinhas. Bacilos Gram negativos, como, *E. coli* e *Salmonella spp*., podem ser transmitidos das superfícies presentes nos banheiros, tais como, paredes, pias e vaso sanitário para as mãos e, assim para outras superfícies da casa e roupas (Bloomfield et al.2012).

Além disso, mãos contaminadas por patógenos, podem resultar em contaminação cruzada em alimentos e bebidas e causar gastroenterites em consumidores (Baker & Bloomfield 2000). As gastroenterites são amplamente disseminadas e compõem o *ranking* das principais causas mundiais de mortalidade, resultando em 1,5 milhão de mortes por ano no mundo, gerando consideráveis gastos econômicos (WHO 2014).

Para enfatizar a contaminação cruzada dentro de cozinhas domésticas, Cogan e colaboradores (1999) realizaram um estudo com carnes de frango contaminadas com *Salmonella spp.* ou *Campylobacter spp.* Durante a manipulação dos alimentos, as bactérias foram disseminadas para as mãos dos manipuladores e mais de 30,0 % dos utensílios utilizados para preparo do alimento, apresentaram contaminação. Os utensílios e superfícies analisadas foram tábua de cortar alimentos, pano de prato, torneiras, fornos, refrigerador e porta da cozinha. Esse tipo de contaminação cruzada em cozinhas domésticas pode resultar em gastroenterites em todos os membros residentes (Bloomfield & Scott 2013).

Rusin e colaboradores (2002) conduziram uma pesquisa com objetivo de avaliar a transferência de bactérias Gram negativas e Gram positivas de fômites porosos e não porosos comumente presentes em residências. Nesse estudo, foi preparada uma mistura com as bactérias *Serratia rubidea* e *Micrococcus luteus* e então inoculada em esponjas e panos de prato,

representando fômites porosos, e inoculada também em telefone e torneira da pia, representando fômites não porosos. Todos os objetos testados foram previamente descontaminados com álcool 70,0 %. A partir daí, foi solicitado que voluntários segurassem os fômites em estudo com as mãos. Em seguida a superfície das mãos dos voluntários foram coletadas para os procedimentos microbiológicos. Após as análises microbiológicas, os autores concluíram que todos os objetos contaminados transferiram as bactérias para as mãos dos voluntários. Concluíram também que os fômites não porosos em estudo (telefone e torneira da pia) foram mais eficientes na transferência dessas bactérias, em relação aos fômites porosos (pano de prato e esponjas).

2.1.1.3 Fômites em ambientes comunitários

Diversos objetos e superfícies ambientais presentes no cotidiano dos seres humanos podem estar contaminados por micro-organismos, sendo então caracterizados como fômites (Nicas & Sun 2006; Gerba & Pepper 2009; Bright et al. 2010). Livros, brinquedos, celulares, computadores, maçanetas, bancadas, pias, tábuas, chão, parede e teto, são exemplos de fômites com potencial de transmitir micro-organismos quando em contato com os seres humanos (Bhoonderowa et al. 2014; Ryan et al. 2014).

Angelakis e colaboradores (2014) realizaram um levantamento bibliográfico de vários estudos que avaliaram a contaminação bacteriana em cédulas de dinheiro e moedas. Os dinheiros são entregues diariamente de pessoa a pessoa com diferentes noções de higiene favorecendo a disseminação bacteriana. Diversos estudos já isolaram as espécies bacterianas *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella spp*., *P. mirabilis*, *S. aureus* e *Enterococcus spp*. em vários países diferentes, como Estados Unidos, Índia, Irlanda, Austrália, Arábia Saudita e Canadá. Essas espécies foram isoladas tanto em cédulas de dinheiros quanto em moedas e por isso, os autores concluem que o dinheiro pode ser um importante fômite disseminador de bactérias patogênicas em diversos ambientes comunitários (Kuria et al. 2009; Elumalai et al. 2012; Kumar et al. 2014).

Locais com grande concentração de pessoas são mais propícios à disseminação de bactérias. Vários estudos evidenciaram fômites veiculando micro-organismos nos mais diversos ambientes urbanos, tais como creches

(Ibfelt et al. 2015), escolas (Bright et al. 2010), escritórios (Boone & Gerba 2010), residências (Medrano-Félix et al. 2011; Sinclair & Gerba 2011), áreas públicas (Reynolds et al. 2005) e nos transportes coletivos (Lutz et al. 2014).

2.1.1.4 Fômites em transportes coletivos urbanos

O sistema de transporte público coletivo merece destaque como fonte de propagação de micro-organismos devido à grande circulação de pessoas diariamente. Os usuários desses serviços estão em constante contato com superfícies como catracas, corrimãos, assentos, portas e janelas, além de não possuírem estrutura para higienização das mãos. Consequentemente, cria-se um ambiente propício para a contaminação e disseminação de micro-organismos (Lutz et al. 2014).

Lutz e colaboradores (2014) realizaram nos Estados Unidos, uma pesquisa em superfícies no interior de 40 ônibus com o objetivo de determinar a prevalência de *S. aureus* e MRSA contaminando as superfícies desses veículos. As superfícies alvo foram aquelas que os autores consideraram de maior contato com a pele, tais como os assentos, corrimãos, porta traseira e cabine do motorista. Eles estimaram a presença de *S. aureus* em 68,0 % dos ônibus e 63,0% de MRSA contaminando as superfícies coletadas. Os autores ainda observaram que 17,0 % dos ônibus estavam contaminados por *S. aureus* em todas as superfícies alvo e para MRSA essa contaminação foi de 15,0 %. Além disso, foram encontradas similaridades genéticas entre as cepas MRSA isoladas em diferentes pontos de coleta. As regiões mais contaminadas foram os assentos, seguido das portas traseiras e corrimãos. Os autores sugerem que os veículos de transporte público coletivo são potenciais fontes de *S. aureus* e MRSA para os usuários desse sistema, pois as superfícies presentes nesse sistema seguem o modelo mão-fômite e fômite-mão. Sugerem também, que as superfícies pesquisadas devem ser frequentemente higienizadas.

Um estudo exploratório foi realizado a partir de coletas nas mãos de passageiros, em uma estação de trem, no Reino Unido. Foram isolados coliformes totais em 27,5 % das mãos dos voluntários, evidenciando uma elevada prevalência de bactérias de origem fecal (Judah et al. 2010). Apesar da contaminação bacteriana no interior dos trens não ter sido avaliada, sugere-se

que as mãos desses passageiros podem ser fonte de disseminação de bactérias patogênicas, contaminar esses transportes e outros passageiros.

Outro estudo, em Portugal, objetivou estimar a prevalência de MRSA em superfícies frequentemente tocadas no interior de 47 ônibus. As superfícies selecionadas foram corrimãos, punhos, botão de parada e máquina de tíquete. Além disso, os autores também realizaram coleta nas mãos dos usuários desses transportes para verificar a presença de MRSA. Os autores verificaram que 36,2% dos ônibus estavam contaminados por MRSA e a prevalência nas mãos dos passageiros foi de 22,0 %. Adicionalmente, observaram a presença de dois clones tanto nas mãos dos passageiros quanto no interior dos veículos, evidenciando a disseminação de MRSA entre os passageiros e os veículos (Conceição et al*.* 2013).

No Brasil foram identificadas várias espécies bacterianas, tanto Gram positiva, quanto Gram negativas, em corrimãos de ônibus na cidade de Curitiba/PR. Os ônibus que realizavam rotas inter-hospitais apresentaram uma elevada riqueza de espécies bacterianas, dentre elas: *Citrobacter freundii, Enterobacter aglomerans, E. coli, Enterobacter sakazakii, Hafnia alvei, P. aeruginosa, Serratia marcescens, Salmonella* Typhi*, S. aureus* e *Staphylococcus saprophyticus.* A maioria das espécies bacterianas encontradas eram bacilos Gram negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Essas bactérias são consideradas indicadoras de condições higiênico-sanitárias, patógenos oportunistas associados a infecções nosocomiais e comunitárias (Rodrigues et al*.* 2006).

2.2 BACILOS GRAM NEGATIVOS

Os bacilos Gram negativos (BGN) são um grupo de micro-organismos composto principalmente por espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e os Bacilos Gram Negativos Não Fermentadores de glicose (BGNNF). Estão presentes no ambiente e na microbiota dos seres humanos (Giske 2008). Porém, podem ser patogênicos e transmitidos pelo contato entre pessoas e fômites aumentando as chances de contaminação e infecção (Russotto et al. 2015).

Tem sido bem relatado que os BGN possuem capacidade de persistirem por longos períodos em fômites presentes no dia a dia das pessoas (Dickgiesser 1978; Hirai 1991; Kramer et al*.* 2006). A viabilidade desses micro-organismos, mesmo em condições ambientais adversas, favorece surtos com origem na comunidade, derivados da contaminação cruzada devido à má higienização das mãos (Oliveira et al*.* 2013). Tais eventos aumentam as internações hospitalares, aumentam o uso de antimicrobianos, favorecem a resistência bacteriana e geram custos à saúde pública (Ho et al. 2010). Além disso, os BGN podem apresentar elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos e estão associados com altas taxas de mortalidade e morbidade. Sendo assim, são considerados problema mundial de saúde pública (Woodford et al*.* 2010; Morril et al*.* 2015).

2.2.1 Família *Enterobacteriaceae*

As bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* constituem um grupo grande e heterogêneo de bacilos Gram negativos, com 50 gêneros já descritos. São micro-organismos ubíquos, amplamente distribuídos no solo, água e vegetação, além de pertencerem à microbiota, principalmente intestinal, de animais e seres humanos (Guerrero et al*.* 2014).

Algumas espécies como *Shigella spp., Salmonella spp., Yersinia spp.,* são consideradas agentes patogênicos primários, enquanto outras espécies como *E. coli*, *Klebsiella spp., Citrobacter spp., Enterobacter spp., Morganella morganii, Proteus spp., Providencia spp., Serratia spp.* e *Hafnia alvei* fazem parte da microbiota e podem se comportar como patógenos oportunistas. O principal mecanismo de transmissão desses micro-organismos é através do contato com as mãos contaminadas de indivíduos portadores (Fariñas & Martinez-Martinez 2013). A presença desses micro-organismos na água e em alimentos também constitui uma importante via de transmissão para outros indivíduos, sendo responsáveis por desenvolvimento de gastroenterites. Portanto, além de micro-organismos patogênicos, também são indicadores de condições higiênico-sanitárias (Todd et al*.* 2009).

Vários estudos mencionam que as enterobactérias podem colonizar e permanecer viáveis durante longos períodos em superfícies presentes no

ambiente hospitalar, como os equipamentos médicos, prontuários e celulares (Levin et al. 2009; Weber et al. 2010; Galvin et al. 2012). A presença bacteriana nesses ambientes expõe o paciente à colonização por esses micro-organismos que, por sua vez, é um fator de risco para infecção (Huang et al. 2006).

Pacientes hospitalizados, imunossuprimidos ou com uso frequente de antimicrobianos são particularmente suscetíveis à colonização por enterobactérias patogênicas, aumentando as chances de desenvolvimento de infecções (Carratalá et al. 2007).

Quando o paciente apresenta uma infecção hospitalar, ele passa a ser fonte de contaminação para superfícies presentes no ambiente nosocomial. Um estudo realizado em um hospital em Taiwan evidenciou que pacientes com infecções de trato respiratório, urinário e corrente sanguínea, apresentavam as mesmas espécies bacterianas presentes em equipamentos médicos e mesas de trabalho. Nesse estudo, foram isoladas espécies de enterobactérias como *K. pneumoniae* e *Serratia spp.*, em amostras clínicas de escarro, urina e sangue, e as mesmas espécies também foram encontradas nas superfícies pesquisadas (Tang et al. 2014).

Um estudo realizado por Cardoso & Reis (2016) evidenciou a importância das superfícies inanimadas como reservatórios de enterobactérias e de BGNNF. Nesse estudo foi observada uma elevada contaminação em superfícies presentes em uma UTI de um hospital universitário na cidade de Goiânia – GO. Os autores encontraram que 45,5 % das camas analisadas estavam contaminadas por BGN, seguidas por 43,3 % das bandejas e 25,9 % de BGN contaminando o equípo do soro (Cardoso & Reis, 2016).

No entanto, a atenção aos BGN é voltada para o contexto hospitalar. O risco de colonização dos pacientes por bactérias de origem hospitalar a partir de fômites, como monitores cardíacos (Lestari et al. 2013); estetoscópios (Whittington et al. 2009); pias para lavagem das mãos (Roux et al. 2013) é frequentemente evidenciado. Porém, poucos estudos detectaram esses micro-organismos em ambientes comunitários urbanos.

A chance de contaminação por BGN em fômites presentes nos ambientes comunitários urbanos foi ressaltado por Bhoonderowa e colaboradores (2014), a partir de um estudo realizado com celulares de pessoas que não exercem atividades profissionais em instituições de saúde. Mesmo

assim foi possível isolar BGN patogênicos, como *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, contaminando a superfície desses dispositivos. Também foram encontrados BGN patogênicos contaminando objetos presentes em creches. Ibfelt e colaboradores (2015) isolaram e identificaram as espécies *Enterobacter spp.* e *E. coli* em almofadas e sofás, trocadores e vários brinquedos. Martínez-Bastidas e colaboradores (2014) também avaliaram a contaminação bacteriana em *playgrounds* de parques públicos. Foram isolados e *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella spp*., *Serratia spp*. e *Shigella* spp. nas superfícies de todos os brinquedos analisados. Com isso, nota-se que os BGN também podem ser agentes contaminantes em diversos ambientes comunitários urbanos, portanto, mais estudos são necessários para relacionar a presença dessas bactérias em fômites.

Adicionalmente, os estudos com enterobactérias são importantes pela habilidade que esses possuem em adquirir resistência aos antimicrobianos, principalmente a partir da produção de enzimas, como as betalactamases de espectro estendido, betalactamases AmpC e a produção de carbapenemases (Thomson 2010; Cornaglia et al*.* 2011; Evans & Amyes 2014).

2.2.2 Bastonetes Gram Negativos Não Fermentadores de Glicose

As espécies de Batonetes Gram negativos Não Fermentadores de glicose (BGNNF) encontram-se amplamente distribuídas no ambiente, como água, solo, vegetação (Enoch et al*.* 2007). Dentre as diversas espécies pertencentes a esse grupo, as espécies *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* e *Burkholderia cepacia* são consideradas de maior importância epidemiológica, pois são patógenos oportunistas em alguns grupos de risco, como crianças, idosos, pacientes hospitalizados e imunocomprometidos (Zanetti et al*.* 2014). Além disso, possuem resistência intrínseca a múltiplos antimicrobianos e habilidade de adquirir resistência aos antimicrobianos de escolha terapêutica, complicando o tratamento das infecções (Fujitani et al*.* 2011).

Os BGNNF são capazes de se manter viáveis em fômites e o controle da disseminação desses micro-organismos pode ser difícil, uma vez que conseguem resistir a agentes desinfetantes (Vila & Marco 2010). Muitos estudos

relatam a ocorrência desse grupo contaminando sistema de purificação de água utilizada na indústria farmacêutica, hospitais e em água para consumo humano, evidenciando o risco de adquirir infecção por esses micro-organismos (Penna et al. 2002; Stojek et al. 2008; Volker et al. 2010). No Brasil, foi realizado um estudo em um sistema de abastecimento de água em unidades de hemodiálise, no Rio de Janeiro sendo encontrados os BGNNF *P. aeruginosa, A. baumannii* e *S. maltophilia* (Miranda et al. 2015).

2.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS

A resistência bacteriana aos antimicrobianos vem sendo observada desde a introdução da penicilina na prática clínica, em 1940. O ano de 1960 foi marcado pela intensa produção de novos antibióticos, porém, o aumento da resistência bacteriana ocorreu concomitante a introdução de novos fármacos (Davies & Davies 2010). Desde os anos 2000, bactérias classificadas como multirresistentes, ou seja, resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos, representam um desafio mundial (Magiorakos et al. 2012).

Infecções com origem na comunidade ou em pacientes hospitalares causadas por Bastonetes Gram Negativos Multidroga Resistentes (BGNMDR), são consideradas um problema de saúde pública, pois estão associadas com um aumento considerável de morbidade, mortalidade, redução nas opções terapêuticas e custos excessivos nas instituições de saúde (Lautenbach & Perencevich 2014).

A promoção da resistência bacteriana ocorre por vários fatores como uso abusivo e negligente de antimicrobianos em pacientes, e também na agropecuária, sendo que nesse último, a resistência bacteriana pode ser transmitida através das bactérias presentes na carne, leite e outros alimentos (Doyle 2006). Práticas insuficientes de controle de infecção, dispensação descontrolada de antimicrobianos e aumento das viagens internacionais, também são fatores que contribuem para a resistência bacteriana (Yezli et al. 2015).

Os genes que conferem resistência aos antimicrobianos podem ser de origem cromossomal, caracterizando a resistência intrínseca. A transmissão dos genes que conferem resistência a partir dos elementos genéticos móveis, como

integrons e plasmídeos, representam a principal forma de aquisição da resistência aos antimicrobianos entre as bactérias. A mobilidade genética pode ser ampliada por meio de transposons, os quais transportam genes de resistência desde os plasmídeos até os cromossomos. Esta mobilidade é importante, pois permite que a resistência se dissemine através das diversas comunidades bacterianas. A transferência dos genes de resistência pode ser vertical, ou seja, durante a divisão celular, ou horizontal, quando uma cepa resistente transfere os genes para outras cepas, intra ou inter-espécie (Woodford et al. 2010).

A disseminação mundial de bactérias resistentes aos antimicrobianos tem recebido muita atenção, especialmente quando associada a surtos de infecção hospitalar ou na comunidade. Nesse contexto, estudos de epidemiologia molecular são realizados para analisar as bactérias envolvidas e seus genes de resistência (Deschamps et al. 2009).

As bactérias Gram negativas, especialmente as enterobactérias, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* merecem destaque pelo aumento de linhagens resistentes em todo o mundo (Davies & Davies 2010; Livermore, 2012; Tzouvelekis et al. 2012). Estão frequentemente relacionadas com resistência aos agentes betalactâmicos, devido à produção de enzimas betalactamases de espectro estendido, além da resistência aos carbapenêmicos por produção de carbapenemases (Nordman et al. 2011).

2.3.1 Enzimas betalactamases

Os BGN possuem mecanismos de resistência às diversas classes de antimicrobianos, tais como tetraciclinas, aminoglicosídeos e sulfonamidas. Contudo, a resistência aos antimicrobianos do grupo betalactâmico é a mais impactante, pois esses medicamentos são utilizados com maior frequência no tratamento das infecções bacterianas (Souli et al. 2008).

Os betalactâmicos são divididos em penicilinas (ampicilina); cefalosporinas de primeira geração (cefalotina); segunda geração (cefazolina); cefalosporinas de terceira geração (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima) e quarta geração (cefepime); cefamicinas (cefoxitina); monobactâmicos

(aztreonam) e carbapenêmicos (meropenem, imipenem, ertapenem e doripenem) (Magiorakos et al. 2012).

Em geral, a resistência bacteriana aos agentes betalactâmicos possuem três princípios: modificação da proteína ligadora da penicilina, com baixa afinidade aos betalactâmicos; bomba de efluxo, porém o principal mecanismo de resistência é a produção de enzimas betalactamases hidrolíticas (Davies & Davies 2010).

Os genes que codificam as enzimas betalactamases podem ser encontrados no cromossomo ou em elementos genéticos móveis. São classificadas em quatro classes de A a D de acordo com suas sequências de aminoácidos descritas por Ambler (1980). As classes A, C e D são denominadas serina-betalactamases, pois possuem um aminoácido serina em seu sítio ativo, enquanto que a classe B se difere das demais por possuir um metal, principalmente o zinco em seu sítio ativo, sendo denominada de metalo-betalactamase (Ambler et al*.* 1991). As classes A e D são responsáveis pela produção de betalactamases de espectro estendido (*Extended-spectrum Beta-lactamases* - ESBL), originadas a partir da intensa utilização de cefalosporinas de terceira geração, tais como cefotaxima e ceftazidima (Bonnet 2004).

A primeira enzima betalactamase foi descrita na Europa, nos anos 80, associada à espécie *K. pneumoniae.* Na Alemanha, em 1983, foi descrito o primeiro caso de bactéria produtora de ESBL do tipo SHV. Um ano depois foi descoberto o tipo TEM-3 na França. Entre 1986 e 1992 houve vários surtos simultâneos do tipo CTX-M no Japão, Alemanha, Argentina, Itália e França, repercutindo em uma grande relevância epidemiológica devido sua rápida dispersão (Bonnet 2004). Atualmente, as variações de ESBL estão amplamente disseminadas entre as espécies de enterobactérias. Na América Latina foi realizado um monitoramento entre 2008 e 2012 em pacientes com infecção por *K. pneumoniae*. Nesse estudo, foram encontradas 117 ESBL tipo SHV, 21 tipo TEM e 363 tipo CTM-X, sendo que os países Chile, Guatemala e Brasil apresentaram maior detecção de resistência (Kazmierczak et al*.* 2015).

As ESBL classe A são do tipo TEM, SHV e CTX-M e variações e hidrolisam uma ampla gama de substratos como as penicilinas, cefalosporinas de terceira geração e monobactâmicos (Gniadkowski 2001*)*. São inibidas por

inibidores de betalactamases - ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam - e não tem ação contra os carbapenêmicos (García et al. 2010).

A produção de ESBL do tipo CTX-M é de grande relevância, pois frequentemente está associadaa com a resistência aos aminoglicosídeos, sulfonamidas e fluoroquinolonas, dificultando a escolha terapêutica (Paterson 2006). Compreende 40 famílias de enzimas mediadas pelo gene *bla*$_{CTX}$ originado de uma bactéria ambiental denominada *Kluyvera spp.* (Bonnet et al. 2000).

No Brasil existe uma diversidade de enzimas ESBL e são frequentemente encontradas em espécies de enterobactérias como *E. coli*, *P. mirabilis* e *K. pneumoniae* (Bonnet et al. 2000). Em 2007 foram isoladas 41 enterobactérias produtoras de ESBL em um hospital do Rio de Janeiro e foram detectadas 54,0 % do tipo TEM, 25, 0% do tipo SHV e 29,0 % do tipo CTX-M (Vasques et al. 2011). Já no Rio Grande do Sul, entre 2007 e 2009, o perfil de ESBL encontrado em isolados de *E. coli* de um hospital Universitário foi 63,6% do tipo TEM, 40,9 % de SHV e 4,5 % de CTM-X (Oliveira et al. 2009). Contudo, existe pouca informação sobre a disseminação dessas enzimas nas regiões norte, nordeste e centro-oeste brasileiro, limitando a compreensão da distribuição dessas enzimas no Brasil (Rocha et al. 2015).

2.3.2 Resistência mediada por AmpC

O gene *bla*$_{AmpC}$ codifica enzimas do tipo betalactamases pertencentes a classe C da classificação de Ambler (Ambler et al. 1991). Essas enzimas conferem resistência às cefalosporinas, cefamicinas, penicilinas e aos inibidores de betalactamases. Porém, não hidrolisam os carbapenêmicos e cefalosporinas de quarta geração (Ni et al. 2005). Em muitas enterobactérias a expressão do gene *bla*$_{AmpC}$ ocorre em resposta à exposição aos agentes betalactâmicos. A cefoxitina é considerada forte indutora da produção dessa enzima (Jones 1998)

Esse gene pode estar localizado no cromossomo ou em plasmídeos. Geralmente as enzimas AmpC cromossomais são encontradas em diversas espécies de *Proteus spp*., *Citrobacter freundii, Enterobacter spp., Serratia marcescens, Providencia stuartii* e *Morganella morganii* (Jacoby 2009).

2.3.4 Enzimas carbapenemases

Os antimicrobianos carbapenêmicos pertencem ao grupo dos betalactâmicos e são frequentemente utilizados como escolha terapêutica em infecções causadas por BGNMDR (Djahmi et al. 2014).

Entretanto, a introdução dos carbapenêmicos resultou na emergência das enzimas carbapenemases, detectadas primeiramente em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* e, posteriormente, em enterobactérias. Funcionalmente, as carbapenemases possuem atividade de hidrolisar os carbapenêmicos, cefalosporinas, penicilinas, monobactâmicos e inibidores de betalactamases (Papp-Wallace et al. 2010). A resistência aos carbapenêmicos pode ser atribuída às enzimas carbapenemases, OXA-carbapenemases e as metalo-betalactamases (Jean et al. 2015).

Atualmente são descritos quatro grupos de enzimas carbapenemases. São elas: SME, primeiramente associada à *Serratia marcescens* (Queenan et al. 2006); IMI, associada ao *Enterobacter cloacae* (Rasmussen et al. 1996); GES (Poirel et al. 2000b) e KPC (Naas et al. 2008), sendo as duas últimas descobertas primeiramente em *K. pneumoniae*.

No Brasil, já foram reportados isolados de *K. pneumoniae, E. coli* e *Serratia marcescens* produtores de carbapenemases (Endiamiani et al. 2009; Meyer et al. 2009; Beirão et al. 2011). O primeiro relato de bactéria produtora de carbapenemase ocorreu em uma UTI de um hospital em Recife-PE no ano de 2005 (Monteiro et al. 2009). Nesse estudo, foram isoladas a espécie *K. pneumoniae* e com a utilização da técnica de PCR foi possível detectar a presença do gene bla_{kpc} no DNA das cepas isoladas. Entre 2009 e 2010 foram relatados vários casos de BGN produtores de carbapenemase principalmente na região Sul e Sudeste: três casos em hospitais do Espírito Santo; 12 em Minas Gerais; três em Santa Catarina e 70 em São Paulo. No Centro Oeste foram relatados 157 casos no Distrito Federal e quatro casos em Goiás (ANVISA 2010b).

As Oxa-carbapenemases são agrupadas na classe D da classificação de Ambler (Ambler et al. 1991). Podem ser encontradas tanto no cromossomo quanto em plasmídeos e possuem diferentes variações como OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-51. Possuem atividade de hidrolisar os carbapenêmicos,

penicilinas e algumas cefalosporinas de espectro estendido, como a ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima e cefepime (Poirel et al. 2000a). As oxa-carbapenemases foram reportadas primeiramente em *P. aeruginosa*, mas atualmente essas carbapenemases podem ocorrer em várias outras bactérias Gram negativas, incluindo a família *Enterobacteriaceae* (Rasmussen & Hoiby 2006).

As metalo-betalactamases (MBL) pertencem à classe B da classificação de Ambler (Ambler et al. 1991). São capazes de hidrolisar todos os antibióticos betalactâmicos, com exceção dos monobactâmicos; conferem resistência aos inibidores de betalactamases e possuem atividade de carbapenemase (Cornaglia et al. 2011). Foram reportadas pela primeira vez em 2006 em isolados de enterobactérias em hospitais da Índia (Castanheira et al. 2011). As MBL adquiridas com maior frequência nas bactérias Gram negativas patogênicas são do tipo IMP e VIM. Essas enzimas foram originalmente descritas em *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, mas atualmente são descritas também nas enterobactérias (Poirel et al. 2000a).

Em 2008 foi descrita pela primeira vez uma enzima MBL denominada de New Delli metalo-betalactamase-1 (NDM-1), em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* de pacientes de um hospital em Nova Deli, Índia (Kumarasamy et al. 2010). Em Nova Deli, bactérias produtoras de NDM-1 foram encontradas contaminando o ambiente e em turistas que viajavam para essa região. A colonização retal por enterobactérias produtoras de NDM-1 favorece a transmissão para a comunidade através da contaminação oro-fecal por meio das mãos, alimentos e água contaminada (Leverstein-Van et al. 2010).

A partir de 2010 vários isolados de enterobactérias foram relatados produzindo NDM-1 em todo o mundo, tanto em pacientes hospitalizados quanto em infecções adquiridas na comunidade (Kumarasamy et al. 2010; Nordmann et al. 2011; Poirel et al. 2011). No Brasil já foram relatadas espécies bacterianas carregando o gene bla_{NDM-1}. Em 2013, em um hospital público de Porto Alegre/RS, o gene foi detectado no genoma das espécies *Entererobacter cloacae* e *Providencia rettigeri* (ANVISA 001/2013). Na cidade de Goiânia/GO já foram confirmados seis casos de *P. aeruginosa* produtora de MBL portando o gene bla_{SPM-1}. A enzima MBL tipo SPM-1 foi descrita pela primeira vez em São

Paulo e é frequentemente encontrada entre bactérias produtoras de MBL no Brasil (De-Oliveira et al. 2014).

3 JUSTIFICATIVA

Os bacilos Gram negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e os BGNNF estão presentes na microbiota dos seres humanos e podem ser encontrados contaminando diversos fômites. O contato de pessoas com fômites pode colaborar com a transmissão e disseminação desses micro-organismos entre ambientes e seres humanos, elevando o risco de infecção (Russotto et al. 2015). Infecções por essas bactérias aumentam as internações hospitalares, aumentam o uso de antimicrobianos, favorecem a resistência bacteriana e geram custos à saúde pública (Oliveira 2013).

No entanto, a atenção aos bacilos Gram negativos é voltada para o contexto hospitalar. O risco de adquirir uma infecção hospitalar através de fômites como eletrocardiogramas (Lestari et al. 2013); estetoscópios (Whittington et al. 2009); aparelhos de ultrassonografia (Shokoohi et al. 2015) é frequentemente evidenciado. Contudo, poucos estudos relacionam esses micro-organismos em ambientes comunitários urbanos. Sendo assim, são necessários mais esforços para apoiar diretrizes de controle das infecções adquiridas na comunidade.

Dentre os diversos estudos direcionados aos fômites encontrados nos ambientes comunitários urbanos (Bright et al., 2010; Gerhardts et al., 2012; Hubner et al., 2011; Bhoonderowa et al., 2014; Angelakis et al., 2014), poucos relacionam os componentes do sistema de transporte público, por exemplo, os ônibus, como fômites com potencial de contaminação microbiológica (Rodrigues et al., 2006). O sistema de transporte público coletivo é fundamental para o desenvolvimento das cidades e essencial para a população, pois possibilita o deslocamento diário dos cidadãos e permite uma maior igualdade de acesso às oportunidades indispensáveis para a qualidade de vida, por exemplo, educação, saúde, moradia, trabalho e lazer (Martins 2015).

Na maioria das cidades do Brasil, os ônibus são o principal meio de transporte público coletivo. A transmissão de micro-organismos nesses ambientes é favorecida pelo elevado número de pessoas e impossibilidade de realizar higienização das mãos durante e após o uso desse transporte (Miller & Diep 2008; Lutz et al. 2014).

Na região metropolitana de Goiânia, o serviço de transporte público coletivo de passageiros é sistematizado pela Rede Metropolitana de Transporte Coletivo (RMTC), constituída pela capital do Estado de Goiás e municípios do entorno, os quais são ligados por interesses econômicos e sociais (RMTC, 2016). Atualmente, o principal corredor do sistema de transporte coletivo da Região Metropolitana de Goiânia é a Linha Leste-Oeste (Eixo–Anhanguera), coordenada pela sociedade mista METROBUS TRANSPORTE COLETIVO S/A, criada em 1997 (METROBUS, 2013).

O Eixo-Anhanguera possui extensão de 13,5 km e uma frota composta por 97 ônibus, sendo 90 ônibus em circulação diariamente e sete em situação de reserva. A empresa também é responsável por 19 estações (plataformas) de embarque/desembarque e cinco terminais de integração instalados ao longo do corredor (Padre Pelágio, DERGO, Praça A, Praça da Bíblia e Novo Mundo). É considerada a linha de maior carregamento do sistema, sendo realizado o transporte de aproximadamente 200.000 mil passageiros diariamente (METROBUS 2013).

Os passageiros usuários desse sistema estão em contato com superfícies presentes no interior dos ônibus, como as barras fixas verticais e horizontais que possuem a função de apoiar os passageiros durante o tráfego do veículo e também podem estar em contato com as catracas de entrada e saída presentes nas plataformas e terminais de integração. Além disso, os ônibus dessa linha transportam passageiros para regiões próximas a instituições de saúde, podendo ser região de dispersão de bactérias patogênicas de origem nosocomial, como *P. mirabilis*, *A. baumannii* e *E. coli*. A circulação de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos é característica de ambientes hospitalares, mas também estão cada vez mais presentes na comunidade.

Portanto, a caracterização dos micro-organismos contaminando as superfícies presentes no sistema de transporte público é de grande importância para evidenciar o risco de contaminação para os usuários desses transportes, além das chances de contaminação e colonização por espécies multirresistentes aos antimicrobianos. A incorporação dessas informações na epidemiologia local e nacional pode contribuir com as ações de vigilância em saúde pública e auxiliar no estabelecimento de diretrizes para o controle de doenças infeciosas relacionadas as más condições higiênico-sanitárias.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Estimar a prevalência de contaminação microbiológica por bastonetes Gram negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e os Bastonetes Gram Negativos Não Fermentadores em barras fixas dos ônibus e catracas das plataformas e terminais da linha Leste-Oeste do sistema público de transporte coletivo do município de Goiânia-GO.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar bastonetes Gram negativos obtidos das barras fixas, verticais e horizontais, dos ônibus e catracas das plataformas e terminais do sistema de transporte público coletivo de Goiânia-GO;
- Determinar o perfil de suscetibilidade dos micro-organismos isolados aos antimicrobianos testados;
- Caracterizar, geneticamente, mecanismos de resistência aos antimicrobianos;
- Avaliar a similaridade genética entre as diferentes cepas circulantes no transporte público coletivo de Goiânia-GO.

5 MÉTODOS

5.1 AMOSTRAGEM

As coletas das amostras foram realizadas na linha Leste-Oeste da RMTC do município de Goiânia, estado de Goiás, no período de agosto de 2012 a julho de 2013 (Figura 01). Foi emitida autorização junto à RMTC e à Metrobus, permitindo que as coletas fossem realizadas em todos os ônibus, terminais e plataformas da linha (Anexo 01).

Figura 1: Mapa completo da linha Leste-Oeste, do município de Goiânia, GO. Legenda: ⟝ bairros abastecidos pela linha; ● plataformas de embarque/desembarque; ● terminais de integração. Fonte: Metrobus, 2013. Disponível em http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2013-10/mapa-eixo.jpg

Foi realizada uma lista com os números dos ônibus em circulação na Linha Leste-Oeste para para que não ocorresse mais de uma coleta no mesmo ônibus (Anexo 2). As coletas foram realizadas diariamente, com o veículo em tráfego, após o horário de pico, entre 9 e 11 horas no período matutino e 14 e 17 horas no período vespertino.

5.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Com o auxílio de *swabs* estéreis foram coletadas amostras das barras fixas verticais e horizontais das quatro portas de entrada/saída de todos os 90 ônibus que circulavam na linha, bem como de todas as catracas de entrada e saída dos cinco terminais e das 19 plataformas que se encontram dispostas ao longo da linha.

Os *swabs* umedecidos em caldo BHI (*Brain Heart Infusion* - Caldo Infusão de Cérebro e Coração) (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA), foram firmemente friccionados no local a ser coletado em movimentos rotatórios, acondicionados em tubos estéreis contendo 2 mL do mesmo caldo e encaminhados imediatamente ao Laboratório de Bacteriologia Aplicada do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG) para posterior processamento.

5.3 PROCEDIMENTOS MICROBIOLÓGICOS

O caldo BHI contendo as amostras coletadas foi homogeneizado por aproximadamente 10 segundos em vórtex e incubado por 24 horas a 35,0 ºC para o crescimento bacteriano e posterior semeadura e isolamento.

Os procedimentos laboratoriais para semeadura e isolamento das espécies de interesse foram realizados de acordo com a metodologia recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Anvisa 2010a). A semeadura das amostras coletadas foi realizada em ágar MacConkey (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) para o isolamento dos bacilos Gram negativos e em ágar cetrimide (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) acrescido de 1,0 % de glicerol para o isolamento de *P. aeruginosa*. Em seguida foram submetidos à incubação por 24 horas a 35,0 °C. Após a incubação as características morfológicas das colônias foram observadas e então a coloração de Gram foi realizada para a confirmação dos bacilos Gram negativos sob microscopia óptica. Somente um morfotipo de cada colônia foi isolado e armazenado em TSB (*Tryptic Soy Broth* – Caldo Triptona de Soja)

(Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) com 30,0 % de glicerol, em temperatura de – 80 ºC, para análises subsequentes.

5.4 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Os isolados congelados em TSB com glicerol foram subcultivados em ágar nutriente (Himedia, Mumbai, Maharashtra, Índia) e incubados a 35,0 °C para a realização da extração do DNA genômico, seguindo a metodologia de extração por ebulição proposta por Pina (2012), com modificações.

A partir do crescimento de colônias isoladas em ágar nutriente foi realizada uma suspensão de 4 a 5 colônias bacterianas em 50,0 µL de água miliQ esterilizada em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, submetidos a dois minutos de centrifugação a 15.000 rpm. Após a centrifugação, a suspensão foi homogeneizada em 50,0 µL de água miliQ esterilizada e aquecida em água à temperatura de ebulição (aproximadamente 100,0 °C) durante 15 minutos, para a lise das células bacterianas e liberação do DNA. Posteriormente a lise, foi realizada centrifugação por dois minutos a 15.000 rpm e então 50,0 µL do sobrenadante foi recolhido e adicionado a um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 50,0 µL de água miliQ esterilizada. O DNA extraído foi mantido sob refrigeração (- 20,0 ºC) e utilizado como DNA *template* para as reações moleculares.

5.5 PCR MULTIPLEX PARA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE INTERESSE

A técnica de PCR multiplex (PCRm) para especiação dos bacilos Gram-negativos encontra-se validada e padronizada no Laboratório de Bacteriologia Aplicada. O DNA *template* extraído por ebulição foi utilizado para a identificação molecular das espécies dos bacilos Gram negativos. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de amplificação para a identificação das espécies de interesse estão listados no Quadro 1.

Quadro 1: Relação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCRm para a identificação das espécies de interesse isoladas do sistema de transporte público de Goiânia-GO.

Espécie	Sequência (5'→3')		Tamanho do *Amplicon* (pb)	Referência
Hafnia alvei	*Forward*	CTAACTCCGTGCCAGCAGCCG	393	Este estudo
	Reverse	GCGGCCGTACTCCCCAGG		
Enterobacter aerogenes	*Forward*	GGATCATGCCGTTAAAATGGACC	100	Este estudo
	Reverse	CGGTGAACGGCGGAAACG		
Acinetobacter baumannii	*Forward*	GATGGATTGGTGCCTTCGGG	178	Este estudo
	Reverse	GTCGTCCCCGCCTTCCTCC		
Proteus mirabilis	*Forward*	GCGGGGAGGAAGGTGATAAGG	458	Este estudo
	Reverse	GCGGCCGTACTCCCCAGG		
Stenotrophomonas maltophilia	*Forward*	CGTGCCAGCAGCCGCC	374	Este estudo
	Reverse	CCAGGCGGCGAACTTAACG		
Pseudomonas oryzihabitans	*Forward*	GCCGCGTGTGTGAAGAAGGTC	501	Este estudo
	Reverse	GCGGCCGTACTCCCCAGG		
Escherichia coli	*Forward*	ACCAGACCCAGCACCAGATAAG	101	Pavlovic et al. 2011
	Reverse	CTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGA		
Shigella sp	*Forward*	GTCTGATATCTACCCGCTTCGC	82	Pavlovic et al. 2011
	Reverse	AGAACGGTTTGTGGTTAATCAGGA		
Pseudomonas aeruginosa	*Forward*	GCCTCTACCAGTACCTGCTAC	190	Fazzeli et al. 2012
	Reverse	AATAGAACAGCTCCAGCAGG		
Klebsiella pneumoniae	*Foward*	GGCTGTACTACAACGATGAC	931	Jeong et al. 2013
	Reverse	TTGAGCAGGTAATCCACTTTG		
Citrobacter freundii	*Forward*	TGTCGAGCAGATGGATGAGCAT	508	Lin et al. 2007
	Reverse	ACGGCTGAAGGTTACGGACCGA		
Salmonella sp.	*Forward*	ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT	243	Lin et al. 2007
	Reverse	AGACGACTGGTACTGATCGATAAT		
Serratia marcescens	*Foward*	TGCCTGGAAAGCGGCGATGG	175	Joyner et al. 2014
	Reverse	CGCCAGCTCGTCGTTGTGGT		

As reações de multiplex variaram nas concentrações de $MgCl_2$, sendo a reação 1 (*Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*),

reação 2 (*A. baumannii* e *Shigella sp.*) e reação 3 (*E. coli* e *H. alvei*) com 3,0; 2,5 e 2,0 mM de $MgCl_2$, respectivamente; e reações 4 (*Citrobacter freundii*, *Salmonella sp.* e *Serratia marcescens*) e 5 (*Stenotrophomonas maltophilia* e *Pseudomonas orizyhabitans*) ambas com 2,0 mM $MgCl_2$. A reação 6 *(Klebsiella pneumoniae*) – 1,5 mM $MgCl_2$, foi realizada por PCR monoplex.

Para os demais reagentes, as reações de amplificação foram realizadas com as seguintes concentrações: tampão de reação (20,0 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50,0 mM KCl; 1,5 mM $MgCl_2$); 1,0-2,5 µM de cada desoxirribonucleotídeo fosfatado (dNTP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); 0,25 µM de cada oligonucleotídeo iniciador; 1,0 U de AmpliTaq DNA polimerase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 10-100 ng do DNA *template*, obtendo volume final de 25,0µL. A reação de amplificação foi submetida a seguinte programação: 5 minutos a 95,0 ºC, 35 ciclos de 30 segundos a 95,0 ºC, 45 segundos a 60,0 ºC, 2 minutos a 72,0 ºC e uma extensão adicional de 7 minutos a 72,0 ºC no termociclador da marca Axygen®. Após a ciclagem, os produtos foram mantidos a 4,0 ºC até o momento da eletroforese.

Para o controle positivo da identificação, o DNA foi extraído de cepas padrão ou cepas geneticamente conhecidas de cada espécie de interesse e utilizado nas reações de PCR: *Escherichia coli* ATCC 25922; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442; *Proteus mirabilis* LACEN-GO; *Shigella flexneri* ATCC 12022; *Acinetobacter baumannii* CCT 1432; *Hafnia alvei* ATCC 13337; *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048; *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 17666; *Salmonella spp*. LACEN-GO*; Serratia marcescens* ATCC 13380. O controle positivo das espécies *Citrobacter freundii Pseudomonas oryzihabitans* foi realizado a partir de isolados clínicos anteriormente identificado por Bactray®. Para o controle negativo, foi utilizada a água MilliQ esterilizada. Marcador de 50 bp (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado como padrão de peso molecular posicionado na extremidade do gel. A eletroforese dos produtos de amplificação foi realizada em gel de agarose a 1,5 % em tampão Tris-Borato-EDTA 0,5 X por 1 hora a 80,0 V e 1 hora e 30 minutos a 100,0 V. Os géis foram visualizados após coloração com brometo de etídeo, fotografados sob transiluminação ultravioleta e capturados com o sistema Molecular ImagerGelDoc XR (BioRad Laboratories).

5.6 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Todas as espécies de bactérias Gram negativas identificadas foram submetidas ao Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA) pelo método de disco difusão em meio ágar Müeller-Hinton (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), conforme preconizado pelo CLSI (2016).

Junto ao TSA foi realizado o teste fenotípico para a observação da possível produção de enzimas do tipo AmpC, enzimas betalactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases.

5.6.1 Método de Disco Difusão

A suscetibilidade aos antimicrobianos de todas as bactérias identificadas foi determinada pelo método de disco difusão em ágar Müeller-Hinton. A partir de colônias previamente isoladas em ágar nutriente foi realizada uma suspensão bacteriana equivalente a escala 0,5 de MacFarland. Essa suspensão foi inoculada em uma placa de ágar Müeller-Hinton, onde posteriormente foram adicionados os discos de antimicrobianos (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil) a uma distância de 24,0 mm de cada disco, e então as placas foram incubadas por 24 horas a 35,0 °C.

Os antimicrobianos foram escolhidos seguindo as orientações do CLSI (2016) e foram testados de acordo com as espécies identificadas. Os antimicrobianos escolhidos estão listados no Quadro 2.

O controle de qualidade foi realizado com a cepa *Escherichia coli* ATCC *25922*. O diâmetro do halo formado pela inibição do crescimento bacteriano foi interpretado de acordo com os pontos de cortes descritos no documento M100S26E do CLSI (2016).

Quadro 2: Relação dos antimicrobianos testados para cada espécie identificada para a realização do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.

Antimicrobianos (Concentração - µg)	BGNNF	*Enterobacteriacceae*
Ampicilina (10,0 µg)		X
Ampicilina + Sulbactam (10,0/10,0 µg)	X	
Amoxicilina + Ácido Clavulânico (20,0/10,0 µg)		X
Amicacina (30,0 µg)	X	X
Aztreonam (30,0 µg)		X
Cefepime (30,0 µg)	X	X
Cefoxitina (30,0 µg)		X
Ceftazidima (30,0 µg)	X	X
Ceftriaxona (30,0 µg)	X	X
Ciprofloxacino (5,0 µg)	X	X
Ertapenem (10,0 µg)		X
Gentamicina (10,0 µg)	X	X
Imipenem (10,0 µg)	X	X
Meropenem (10,0 µg)	X	X
Sulfametoxazol + Trimetoprim (1,2/23,7 µg)	X	X
Piperacilina + Tazobactam (100,0/10,0 µg)		X

5.6.2 Detecção fenotípica de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos

Todos os procedimentos de detecção fenotípica de resistência foram realizados de acordo com o proposto pelo CLSI (2016).

A detecção fenotípica de bactérias produtoras de betalactamases do tipo AmpC foi realizada utilizando o disco de cefoxitina (30,0 µg) como marcador. A formação de halo com diâmetro igual ou menor 14,0 mm ao redor do disco, caracteriza fenotipicamente a resistência do tipo AmpC.

Para a identificação do fenótipo ESBL foram testados os discos com os seguintes antimicrobianos: Amoxicilina + Ácido Clavulânico (20,0/10,0 µg) – posicionado no centro da placa – Ceftriaxona (30,0 µg), Ceftazidima (30,0 µg), Cefepime (30,0 µg) e Aztreonam (30,0 µg) a uma distância de 24,0 mm de centro a centro de cada disco. A formação de halos distorcidos, denominado “zona fantasma” confirma a hiperprodução de betalactamases.

Os isolados que apresentaram resistência aos carbapenêmicos foram verificados quanto a produção da enzima carbapenemase, pelo Teste de Hodge Modificado (THM), o qual se baseia na inativação de um carbapenêmico por uma cepa produtora de carbapenemase. Para esse teste, uma suspensão de colônias de *Escherichia coli* ATCC 25922 foi inoculada em ágar Müeller-Hinton conforme realizado no TSA. A partir daí um disco de Meropenem (10,0 µg) foi posicionado no centro da placa e então foram feitas estrias perpendiculares ao disco de antibiótico com a colônia suspeita de produzir carbapenemase. A distorção no halo de inibição de crescimento da *E. coli* prediz a produção de carbapenemase.

A classificação como MDR e Extensivamente Droga Resistente (*Extensively Drug Resistance* – XDR) foi realizada conforme sugerido por Magiorakos e colaboradores (2012). Isolados resistentes a um agente em três ou mais classes de antimicrobianos foram classificados como MDR. Já os isolados sensíveis a apenas duas ou menos classes foram classificados como XDR.

5.7 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

Os isolados fenotipicamente resistentes aos agentes betalactâmicos foram submetidos a extração do DNA plasmidial para detecção de genes que conferem resistência aos betalactâmicos.

Baseado no manual do kit de extração FLEXIPREP da Pharmacia ®, os isolados selecionados foram subcultivados em ágar nutriente por 24 horas à 35,0 ºC. Após 24 horas uma colônia de cada isolado foi inoculada 5,0 mL de água peptonada 1,0 % e incubadas à 37,0 ºC por 24 horas sob agitação de 150rpm. Após essa etapa, uma alíquota de 1,5 mL foi centrifugada a 13.000 rpm em tubo de microcentrífuga por 30 segundos. O processo foi repetido três vezes.

O sedimento foi ressuspenso em 200,0 µL de solução I (100,0 mM Tris – HCl pH 7,5, 10,0 Mm EDTA, 400,0 µg/Ml RNAse I), homogeneizado e adicionados 200,0 µL de solução II (0,2M NaOH, 1,0 % SDS). O material foi homogeneizado por inversão durante 5 minutos e adicionados 200,0 µL de solução III (3,0 M Acetato de sódio, 2,0 M Ácido acético), homogeneizado suavemente por inversão durante 5 minutos e centrifugado a 13.000 por 5 minutos.

O sedimento, correspondente ao DNA cromossomal, foi descartado e o sobrenadante, contendo o DNA plasmidial foi transferido para outro tubo de microcentrífuga. O DNA plasmidial foi precipitado pela adição de 420,0 µL de isopropanol 99,5 %, homogeneizado em vórtex e mantido em repouso durante 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm, sendo o sobrenadante desprezado e o precipitado foi mantido em repouso em temperatura ambiente até a evaporação do isopropanol.

O precipitado foi ressuspenso em 50,0 µL de água destilada estéril, mantido sob refrigeração à – 20,0 ºC, para posteriores reações moleculares.

5.8 PCR CONVENCIONAL PARA DETECÇÃO DOS GENES QUE CONFEREM RESISTÊNCIA AOS AGENTES BETALACTÂMICOS

Para a identificação dos BGN produtores de enzimas betalactamases foi utilizada a técnica de PCR convencional. Os oligonucleotídeos iniciadores

utilizados nas reações de PCR foram desenhados e gentilmente cedidos pela Profª Drª Lilian Carla Carneiro e estão listados no Quadro 3.

Quadro 3: Relação dos oligonucelotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para a detecção de genes produtores de betalactamases.

Tipo de Betalactamase	**Sequência (5'→3')**		**Tamanho do *Amplicon* (pb)**
bla$_{NDM}$	*Forward*	CGGCCGCGTGCTGGTG	182
	Reverse	GGCATAAGTCGCAATCCC	
bla$_{GIM}$	*Forward*	CGGTGGTAACGGCGCAGTG	149
	Reverse	TGCCCTGCTGCGTAACATCG	
bla$_{SIM}$	*Forward*	GCACCACCGGCAAGCGC	156
	Reverse	TGTCCTGGCTGGCGAACGA	
bla$_{CMY}$	*Forward*	GGATTAGGCTGGGAGATG	158
	Reverse	CCAGTGGAGCCCGTTTTATGC	
bla$_{SPM}$	*Forward*	CGAAAATGCTTGATGGGACCG	147
	Reverse	CACCCGTGCCGTCCAAATG	
bla$_{SME}$	*Forward*	GGCGGCTGCTGTTTTAGAGAGG	184
	Reverse	TGCAGCAGAAGCCATATCACCTAAT	
bla$_{CTX}$	*Forward*	CTGAGCTTAGCGCGGCCG	189
	Reverse	AATGGCGGTGTTTAACGTCGG	
bla$_{SHV}$	*Forward*	ATCTGGTGGACTACTCGCCGGT	144
	Reverse	TCAATCCTGCGGGGCCG	
bla$_{CTX-M}$	*Forward*	GCGGCAGTCGGGAGGCA	132
	Reverse	TTCAGCACCGCGGCCG	
bla$_{TEM}$	*Forward*	TCCGTGTCGCCCTTATTCCC	165
	Reverse	CGGGGCGAAAACTCTCAAGG	
bla$_{DHA}$	*Forward*	GCGGGCGAATTGCTGCAT	183
	Reverse	TGGGTGCCGGGGTAGCG	
bla$_{IMP}$	*Forward*	CCAGCGTACGGCCCACAGA	138
	Reverse	GGTGATGGCTGTTGCGGCA	
bla$_{VIM}$	*Forward*	GTTATGCCGCACCCACCCC	194
	Reverse	ACCAAACACCATCGGCAATCTG	
bla$_{OXA}$	*Forward*	GGCAGCGGGTTCCCTTGTC	171
	Reverse	CGATAATGGGCTGCAGCGG	
bla$_{KPC}$	*Forward*	GGCGGCTCCATCGGTGTG	155
	Reverse	GTGTCCAGCAAGCCGGCCT	

As reações de amplificação foram realizadas com as seguintes concentrações de reagentes: tampão de reação (20,0 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50,0 mM KCl; 1,5 mM $MgCl_2$); 1,0-2,5 µM de cada desoxirribonucleotídeo fosfatado (dNTP); 0,25 µM de cada oligonucleotídeo iniciador; 1,0 U de AmpliTaq DNA

polimerase e 10,0-100,0 ng do DNA *template*, obtendo volume final de 25,0 µL. Para o controle negativo da reação, foi utilizada a água MilliQ esterilizada.

A reação de amplificação foi submetida a seguinte programação: 5 minutos a 94,0 ºC, 35 ciclos de 30 segundos a 94,0 ºC, 45 segundos a 55,0 ºC, 2 minutos a 72,0 ºC e uma extensão adicional de 7 minutos a 72,0 ºC no termociclador da marca Axygen®. Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0 % em tampão Tris-Borato-EDTA 0,5 X por 1 hora a 80,0 V. Foi utilizado marcador de 50 bp como padrão de peso molecular posicionado na extremidade do gel. Os géis foram visualizados após coloração com brometo de etídeo, fotografados sob transiluminação ultravioleta e capturados com o sistema Molecular ImagerGelDoc XR (BioRad Laboratories).

5.9 ELETROFORESE EM GEL EM CAMPO PULSADO *(PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS – PFGE)*

O perfil de macrorrestrição das cepas de interesse foi determinado por PFGE pela digestão do DNA total com a endonuclease de restrição *Xba1*, utilizando o aparelho CHEF DRII (Bio-RadLaboratories®, Hercules, CA, USA) de acordo com Ribot e colaboradores (2006) com modificações.

Foi semeada uma colônia de cada isolado em ágar nutriente e após 24 horas de incubação, as colônias foram transferidas com o auxílio de um *swab* umedecido para tubos esterilizados contendo 2,0 mL do tampão de suspensão TE (100,0 mM Tris, 100,0 mM EDTA, pH 8,0), e então ajustada a concentração para OD 1,3 - 1,4 a 610 nm em espectrofotômetro.

Em seguida 200,0 µL da suspensão de bactérias foram transferidas para um tubo de microcentrífuga e adicionado 10,0 µL de Proteinase K (20,0mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) homogeneizada com 200,0 µL de agarose de corrida (agarose *running gel*) 1,0 % para formação de pequenos blocos de gel (*plugs*) contendo o DNA do micro-organismo.

Os *plugs* foram transferidos para tubos Falcon contendo 5,0 mL de tampão de lise (50,0 mM Tris, 50,0 mM EDTA, pH 8,0; 1,0 % sarcosil; 0,1 mg/mL proteinase K) e incubados a 54,0 ºC por um período de duas horas em banho

maria (BM). Após esse período, o tampão de lise foi desprezado e os blocos de gel foram lavados duas vezes com 10,0 mL-15,0 mL de água MilliQ esterilizada pré-aquecida a 50,0 °C em BM com agitação por 10-15´/50,0 ºC e lavados quatro vezes com 10,0 mL de tampão TE (10,0 mM Tris, 1,0 mM EDTA, pH 8,0) esterilizado e pré-aquecido a 50,0 ºC em BM com agitação por 10-15´/50,0 °C. Em seguida os *plugs* foram estocados em tampão TE sob refrigeração.

Para cada isolado, o DNA contido no bloco de gel foi digerido com 2,0µL da enzima *Xba1* (40,0 U/µL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em 200,0 µL do tampão de restrição 1 X e incubado à 37,0 ºC, *overnight*, em BM. A eletroforese em campo pulsado foi realizada em gel de agarose a 1,0 % (agarose *running gel*), em solução tampão Tris-Ácido Bórico-EDTA 0,5 X (Tris 90,0 mM, ácido bórico 90,0 mM e EDTA 2,0 mM) no sistema CHEF DRII (Bio-RadLaboratories, CA, EUA). Para a resolução dos fragmentos de restrição foi utilizado corrente alternando com intervalos de pulso de 2 a 55 segundos a 6,0 V/cm e temperatura de 14,0 ºC por 20 horas. Foi utilizado como padrão de peso molecular Lambda DNA *ladder PFGE* (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) posicionado nas extremidades do gel. Após a eletroforese, os géis foram corados em solução aquosa contendo 0,5 µL/mL de brometo de etídio durante 10 minutos, descorados em água destilada, fotografados sob transiluminação com luz ultravioleta e capturados com o sistema Molecular ImagerGelDoc XR (Bio-Rad). As fotos foram digitalizadas para análise posterior.

Adicionalmente, os géis de PFGE foram utilizados como imagens preto e branco, invertidas de oito bits e processados pelo programa BioNumerics (versão 5.0; *AppliedMaths, Ghent, Belgium*). A construção do dendrograma para avaliar a relação genética entre as cepas foi realizada utilizando o coeficiente de similaridade de Dice (1945), baseado na posição e presença das bandas e no algoritmo de análise filogenética UPGMA (*Unweighted Pair-Groups Method*) através de agrupamentos por médias não ponderadas (Sneath and Sokal, 1973). Os parâmetros de otimização e tolerância foram utilizados com os respectivos valores, 0,8 e 1,1 %. Cada *cluster* foi definido como um grupamento de perfis (n≥2) apresentando um coeficiente de similaridade acima de 80,0 % (Carriço et al. 2005).

5.10 ANÁLISE DE DADOS

A base de dados foi construída com o programa Microsoft Office Excel 2016 com os resultados microbiológicos laboratoriais (micro-organismo isolado, perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e tipagem molecular).

A prevalência de colonização por bacilos Gram negativos e respectivos intervalos de 95,0 % de confiança (IC 95,0 %) foram calculados. As diferenças das proporções entre a contaminação presente em ônibus e plataformas foram comparadas usando o teste de Qui Quadrado e o risco de contaminação foi calculado utilizando o teste de *Odds ratio*. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados resultados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 15.0.

6 RESULTADOS

6.1 PREVALÊNCIA DE CONTAMINAÇÃO DA LINHA LESTE-OESTE POR BACILOS GRAM NEGATIVOS

No período de agosto de 2012 a julho de 2013 foram coletados 852 *swabs*, sendo 720 *swabs* obtidos das superfícies das barras fixas horizontais e verticais dos 90 ônibus em circulação e 132 *swabs* das superfícies das catracas presentes nas plataformas e terminais de integração, em toda extensão da linha Leste-Oeste.

Todos os 852 *swabs* coletados foram submetidos a procedimentos microbiológicos para a cultura e isolamento de BGN. Após 24 horas de incubação a 35,0 °C, houve crescimento de 392 colônias de BGN confirmados pela coloração de Gram e visualizados sob microscopia óptica (Figura 2). Portanto, a prevalência de contaminação por BGN nas superfícies da Linha Leste-Oeste foi de 46,0 % (IC 95% 42,63-49,43).

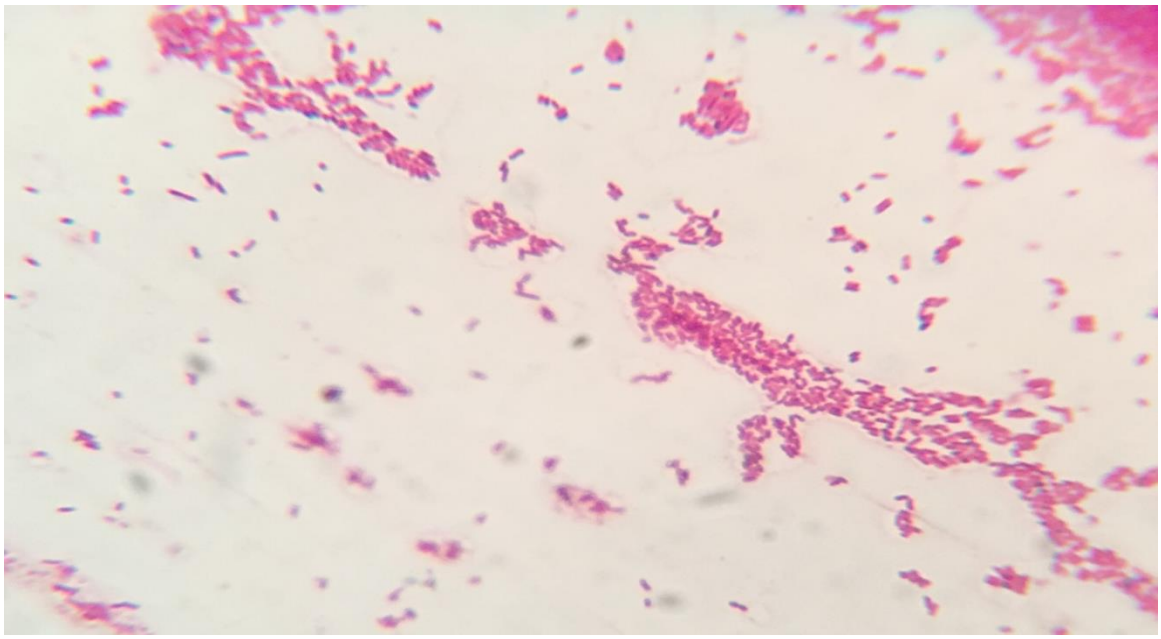

Figura 2: Coloração de Gram dos bacilos Gram negativos isolados das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e catracas de entrada e saída das plataformas e terminais de integração da linha Leste-Oeste do município de Goiânia-GO.

Dentre os 392 BGN isolados, 353 (49,0 %) foram provenientes das superfícies das barras horizontais e verticais dos 90 ônibus em circulação, representando a superfície mais contaminada (*P* = 0,0001; IC 95,0 %; 1,5 – 3,4). Em relação às superfícies das catracas das plataformas e dos terminais de integração, a prevalência de contaminação foi de 29,5 % (Tabela 1).

Tabela 1: Prevalência de contaminação por bacilos Gram negativos, coletados das barras fixas horizontais e verticais dos ônibus em circulação e das catracas das plataformas e terminais presentes em toda a extensão sistema de transporte público coletivo da Linha Leste-Oeste, no município de Goiânia – GO

Local da coleta	**Bacilos Gram negativos**		**Total**	**Valor de *P***
	Crescimento	Ausência		
Ônibus	353 (49,0 %)	367 (51,0%)	720 (100,0%)	*P*=0,0001
Plataformas/Terminais	39 (29,5 %)	93 (70,5%)	132 (100,0%)	
Total	392 (46,0 %)	460 (54,0%)	852 (100,0%)	

A partir desses dados, podemos estimar que, ao realizar o contato com as superfícies presentes no sistema de transporte público coletivo da linha Leste-Oeste, os usuários possuem o risco de 2,3 vezes (*OR* 2,3; IC 95,0%; 1,5 – 3,4) de se contaminarem por BGN presentes nas barras fixas e verticais dos ônibus do que quando em contato com as catracas de entrada e saída das plataformas e terminais.

As coletas foram realizadas em dois períodos, no período matutino, entre 9 e 11 horas e no período vespertino, entre 14 e 17 horas. Dentre as 46 coletas realizadas no período da manhã, foi possível o isolamento de 180 (46,0%) BGN. Já no perído da tarde, foram realizadas 36 coletas, das quais foram isolados 133 (37,0 %) BGN. Portanto, o período matutino representou maior positividade das coletas do que o período vespertino.

6.2 IDENTIFICAÇÃO DOS BGN ISOLADOS POR PCRm

O DNA genômico foi extraído de todas as 392 colônias isoladas para a identificação molecular das espécies e então foi possível a especiação por meio da PCRm. As espécies identificadas estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2: Espécies de BGN identificadas pela técnica PCRm provenientes das barras fixas horizontais e verticais dos ônibus e das catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo Leste-Oeste, no município de Goiânia – GO, no período de agosto de 2012 a julho de 2013.

	Local da coleta		
Identificação	Ônibus	Plataformas/Terminais	Total
A. baumannii	144 (40,8 %)	17 (43,6 %)	161 (41,1 %)
H. alvei	109 (30,9 %)	6 (15,4 %)	115 (29,3 %)
P. mirabilis	92 (26,1 %)	15 (38,5 %)	107 (27,3 %)
E. coli	8 (2,2 %)	1 (2,5 %)	9 (2,3 %)
Total	353 (100,0%)	39 (100,0 %)	392 (100,0 %)

Dentre as 13 espécies bacterianas de interesse, foi possível a tipagem de quatro espécies. A espécie *A. baumannii* foi identificada em 161 isolados (Figura 3), representando 41,1 % (161/392) dos bacilos Gram negativos encontrados nas superfícies em estudo da linha Leste-Oeste. Dentre eles, 89,5 % foram provenientes das superfícies das barras dos ônibus e 10,5 % das catracas das plataformas e terminais.

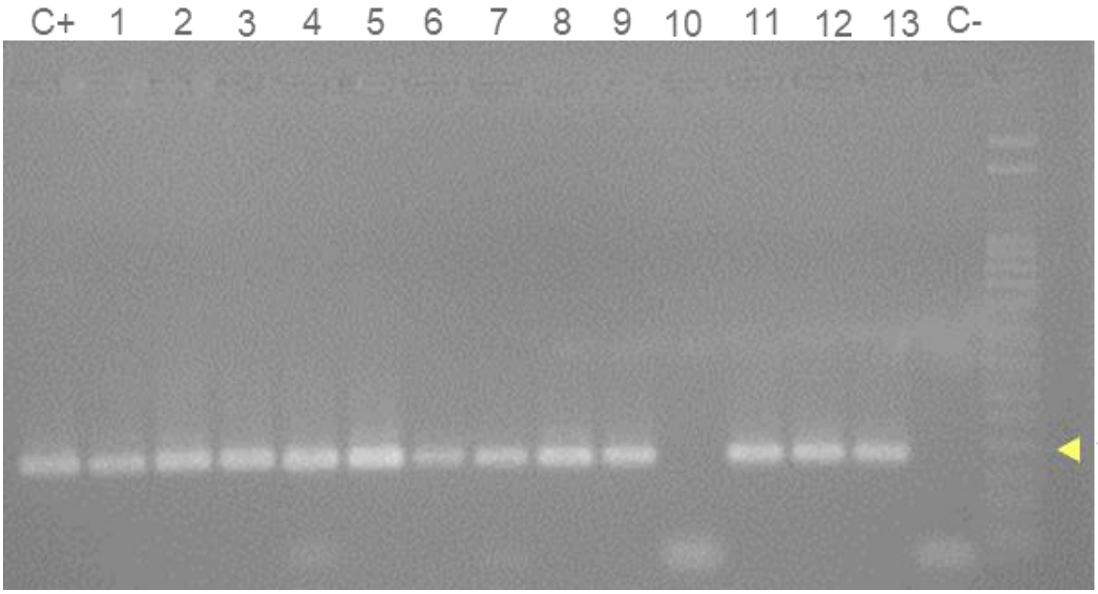

Figura 3: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCRm para detecção da espécie *A. baumannii* nos isolados das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e nas catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo Leste-Oeste, no município de Goiânia – GO. C+: *A. baumannii* (CCT 1432) – 190 pb; colunas 1 a 9 e 11 a 13: amostras positivas; coluna 10: amostra negativa; C-: controle negativo da reação. Seta amarela: marcador de peso molecular 50 pb.

A espécie *H. alvei* foi a segunda espécie mais presente dentre os bacilos Gram negativos, representando 29,3 % (115/392) dos isolados (Figura 4). Destes, 94,8 % foram provenientes das superfícies das barras dos ônibus e 5,2% das catracas das plataformas e terminais.

A espécie *P. mirabilis* foi identificada em 107 isolados (27,3 %) (Figura 5), dos quais 86,0 % foram provenientes das superfícies dos ônibus e 14,0 % das superfícies das plataformas e terminais.

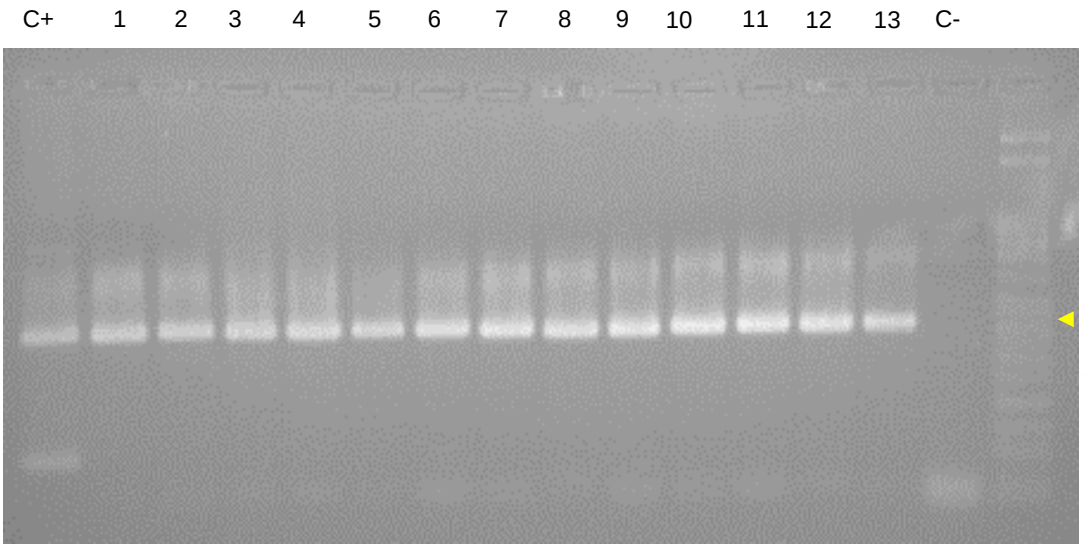

Figura 4: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da *PCR* para detecção da espécie *H. alvei* isolados das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e nas catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo Leste-Oeste, no município de Goiânia – GO. C+: *H. alvei* (*ATCC* 13337) – 393 pb; colunas 1 a 13: amostras positivas; C-: controle negativo da reação. Ponta da seta amarela: marcador de peso molecular 50 pb.

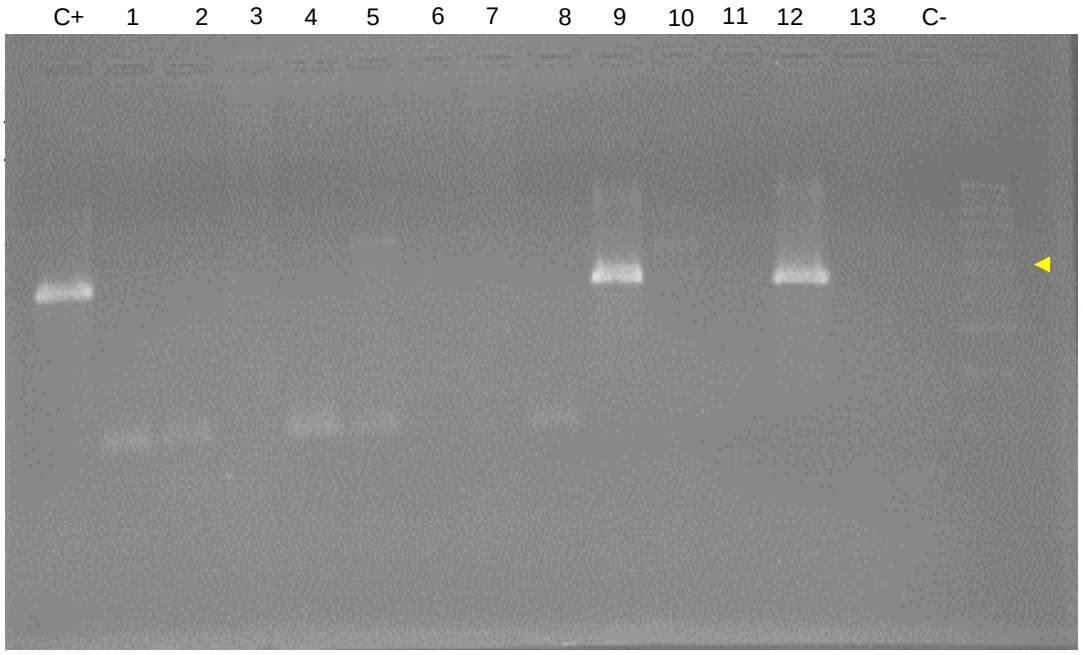

Figura 5: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da mPCR para detecção da espécie *P. mirabilis* isolados das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e nas catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo Leste-Oeste, no município de Goiânia – GO. C+: *P. mirabilis* (LACEN - GO) - 458 pb; colunas 9 e 12: amostras positivas; colunas 1 a 8, 10, 11 e 13: amostras negativas; C-: controle negativo da reação. Seta amarela: marcador de peso molecular de 50 pb.

Ainda foram identificadas 9 (2,3 %) *E. coli* (Figura 6), com 88,9 % originadas das superfícies das barras dos ônibus e 11,1 % das catracas das plataformas e terminais.

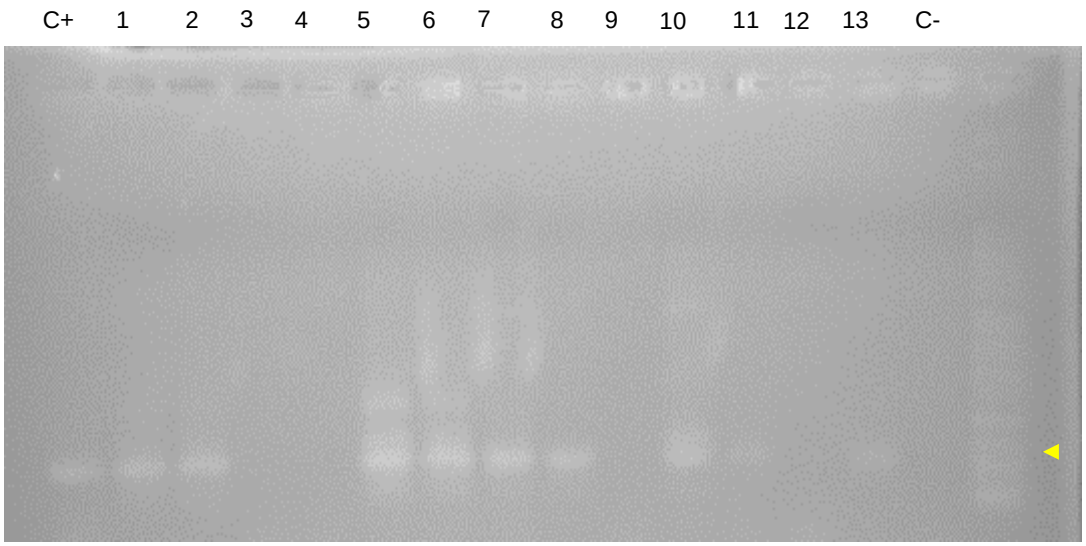

Figura 6: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da mPCR para detecção da espécie *E. coli* isolados das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e nas catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo Leste-Oeste, no município de Goiânia – GO. C+: *E. coli* (*ATCC* 25922) – 101 pb; colunas 1 e 2, 5 a 8, 10, 11 e 13: amostras positivas; colunas 3 e 4, 9 e 12: amostras negativas; C-: controle negativo da reação. Seta amarela: marcador de peso molecular de 50 pb.

6.3 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Todas as espécies identificadas foram submetidas ao TSA para caracterização do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos (Figura 7). Seguindo às orientações do CLSI (2016) foram testados 10 antimicrobianos para os isolados identificados como *A. baumannii*. Dentre os 161 *A. baumannii*, 50 (31,0 %) apresentaram resistência à ceftriaxona, sendo o antimicrobiano com maior número de isolados resistentes, enquanto que 14 (8,7 %) apresentaram resistência ao sulfametoxazol + trimetoprim, 4 (2,5 %) à ceftazidima e 2 (1,2 %) ao cefepime (Tabela 3).

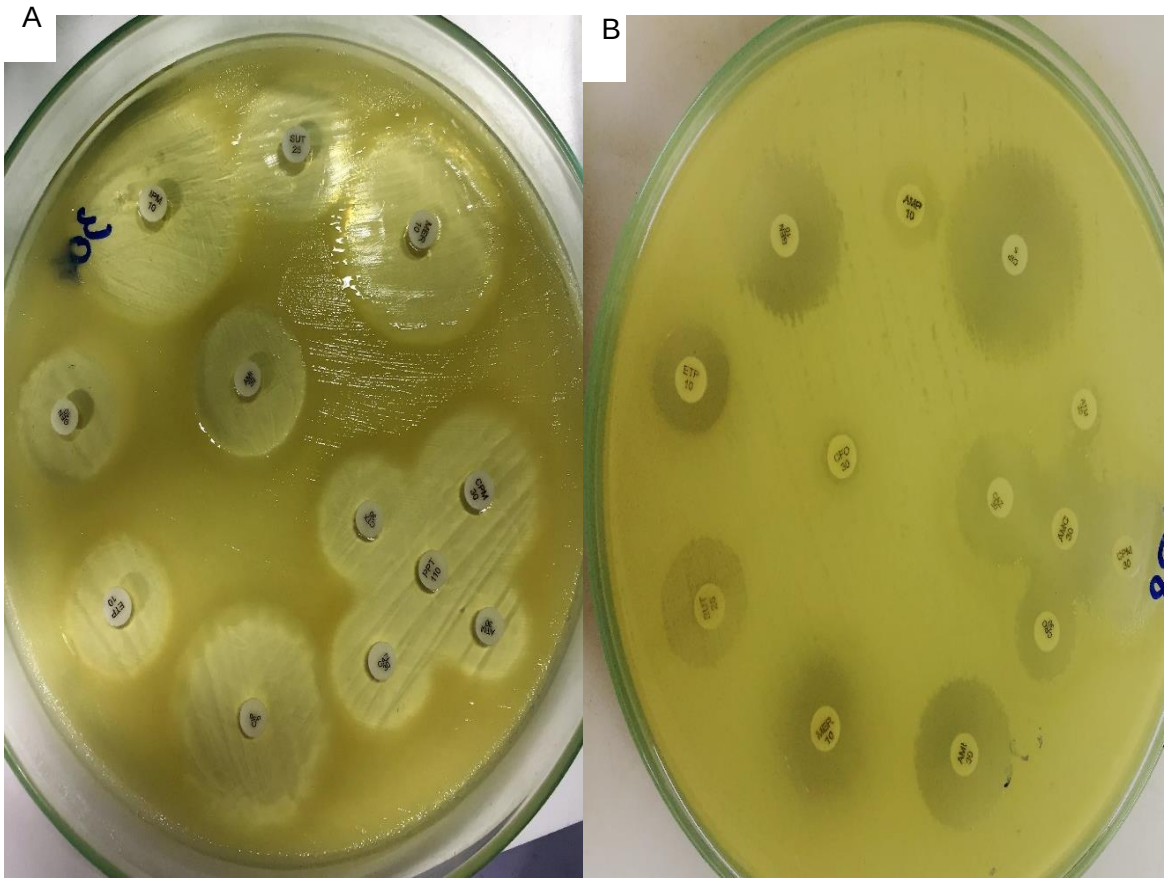

Figura 7: Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos realizado pelo método de disco de difusão com BGN isolados das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e nas catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo Leste-Oeste, no município de Goiânia – GO. A: *H. alvei* apresentando sensibilidade aos antimicrobianos testados. B: *P. mirabilis* com apresentando resistência a várias classes dos antimicrobianos testados.

Tabela 3: Perfil de suscetibilidade dos *A. baumannii* isolados das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e nas catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo Leste-Oeste, no município de Goiânia – GO

Antimicrobianos testados	**Resistência**	
	N°	%
Ceftriaxona	50	31,0
Sulfametoxazol + Trimetoprim	14	8,6
Ceftazidima	4	2,4
Cefepime	2	1,2
Ampicilina + Sulbactam	0	0,0
Imipenem	0	0,0
Meropenem	0	0,0
Gentamicina	0	0,0
Amicacina	0	0,0
Ciprofloxacino	0	0,0

Para as enterobactérias *P. mirabilis* e *E. coli* foram testados 14 antimicrobianos e 12 para a *H. alveii*, seguindo às orientações do CLSI (2016) considerando suas resistências intrínsecas.

Em um total de 107 *P. mirabilis*, 64 (59,8 %) apresentaram resistência à ampicilina. Onze (10,2 %) apresentaram resistência a um agente em três ou mais classes antimicrobianas, sendo caracterizadas como MDR. Ainda foram identificados 3 (2,8 %) sensíveis apenas ao ciprofloxacina, gentamicina e amicacina (Tabela 4), sendo classificados como XDR.

Tabela 4: Perfil de suscetibilidade dos *P. mirabilis* isolados das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e nas catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo Leste-Oeste, no município de Goiânia – GO

Antimicrobianos testados	**Resistência**	
	N°	%
Ampicilina	66	61,7
Cefoxitina	39	36,4
Ceftriaxona	21	19,6
Aztreonam	19	17,7
Cefepime	14	13,1
Ceftazidima	14	13,1
Ertapenem	7	6,5
Sulfametoxazol + Trimetoprim	7	6,5
Amoxicilina + Ácido Clavulânico	5	4,7
Ciprofloxacino	3	2,8
Imipenem	3	2,8
Meropenem	3	2,8
Gentamicina	0	0,0
Amicacina	0	0,0

Dentre as 09 *E. coli*, 4 (44,4 %) foram resistentes à ampicilina, sendo este o antimicrobiano com maior número de isolados resistentes (Tabela 5). Apenas 1 (11,1 %) isolado apresentou resistência a um agente em três ou mais classes antimicrobianas, caracterizado, portanto, como MDR.

Entre todas as 115 *H. alvei* submetidas ao TSA, 49 (42,6 %) apresentaram resistência à ceftriaxona e 48 (41,7 %) foram resistentes ao aztreonam (Tabela 6). Foram observados 14 (10,4 %) isolados resistentes a um agente em três ou mais classes antimicrobianas, considerados como MDR.

Tabela 5: Perfil de suscetibilidade das *E. coli* isoladas das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e nas catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo Leste-Oeste, no município de Goiânia – GO

Antimicrobianos testados	**Resistência**	
	N°	%
Ampicilina	4	44,4
Cefoxitina	3	33,3
Aztreonam	2	22,2
Ceftriaxona	2	22,2
Cefepime	1	11,1
Ceftazidima	1	11,1
Sulfametoxazol + Trimetoprim	1	11,1
Amoxicilina + Ácido Clavulânico	0	0,0
Ertapenem	0	0,0
Imipenem	0	0,0
Meropenem	0	0,0
Gentamicina	0	0,0
Amicacina	0	0,0
Ciprofloxacino	0	0,0

No total, foram identificados 31 isolados com perfil de múltiplas resistências aos antimicrobianos. Em relação a origem dessas bactérias multirresistentes, 30 (8,5 %) foram provenientes dos ônibus em circulação e apenas uma (2,5 %) teve origem em uma catraca de saída de uma plataforma. A estimativa de risco de contaminação dos usuários do transporte público coletivo da Linha Leste-Oeste com bactérias multirresistentes foi 4,2 % (IC 95,0 %; 6,0 – 11,9) para ônibus e 0,7 % (IC 95,0 %; 0,1 – 4,1) para as plataformas/terminais.

Tabela 6: Perfil de suscetibilidade das *H. alvei* isoladas das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e nas catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo Leste-Oeste, no município de Goiânia – GO

Antimicrobianos testados	**Resistência**	
	N°	%
Aztreonam	49	42,6
Ceftriaxona	48	41,7
Ceftazidima	21	18,2
Cefepime	19	16,5
Sulfametoxazol + Trimetoprim	15	13,0
Ertapenem	1	0,8
Piperacilina + Tazobactam	0	0,0
Ciprofloxacino	0	0,0
Imipenem	0	0,0
Meropenem	0	0,0
Gentamicina	0	0,0
Amicacina	0	0,0

Apenas 13 isolados de *P. mirabilis* foram submetidos ao teste fenotípico de detecção da betalactamase do tipo AmpC, pois apresentaram resistência à cefoxitina e as cefalosporinas. Porém, a indução fenotípica do gene bla_{AmpC} foi negativa para as 13 amostras selecionadas (Figura 8A).

A identificação do fenótipo ESBL também foi negativa para todos os isolados testados (Figura 8B). Os isolados que apresentaram resistência aos carbapenêmicos também não expressaram fenotipicamente a indução da carbapenemase através do THM (Figura 8C). Porém, uma *E. coli*, 16 *H. alvei* e 11 *P. mirabilis* apresentaram halos interpretados como resistentes para as cefalosporinas, e destes, três *P. mirabilis* apresentaram resistência aos carbapenêmicos. Portanto, o DNA plasmidial dessas 31 cepas foram extraídas para a detecção dos genes codificadores de betalactamases e carbapenemases.

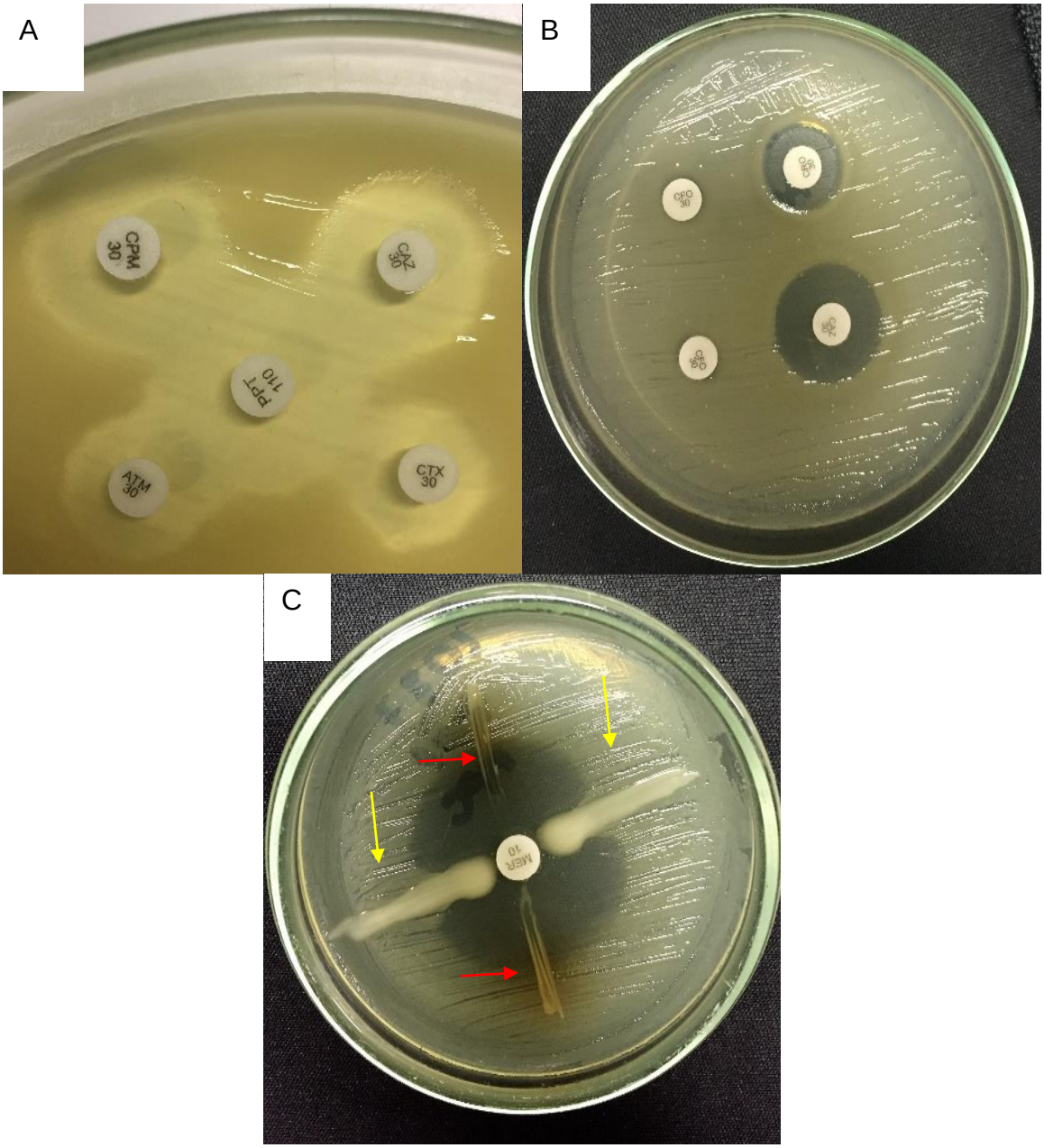

Figura 8: Detecção fenotípica da resistência aos antimicrobianos betalactâmicos. A: resultado negativo da indução do gene *bla*$_{AmpC}$. B: resultado negativo da produção de ESBL. C: resultado negativo do THM; Setas vermelhas: estrias verticais com isolado suspeito de produzir carbapenemase; Setas amarelas: estrias horizontais com o controle positivo de *K. pneumoniae* ATCC *BAA* 17005.

6.4 DETECÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE BETALACTAMASES

As 31 cepas de BGN que expressaram fenotipicamente resistência aos agentes betalactâmicos foram selecionadas para a caracterização molecular quanto a presença de genes codificadores das enzimas betalactamases.

O gene *bla*$_{CTX}$ foi o gene detectado em maior número entre os isolados selecionados (13,0%), sendo três em isolados de *H. alvei* e um em *P. mirabilis* (Figura 9). O segundo gene detectado foi o *bla*$_{TEM}$, presente no DNA plasmidial de duas *H. alvei*, das quais em uma delas também foi detectada a presença do gene *bla*$_{CTX}$ (Figura 10). Todos os isolados que expressaram genotipicamente os genes de betalactamases eram provenientes das barras dos ônibus em circulação. Não foram detectados genes codificadores de betalactamases do tipo AmpC e das enzimas carbapenemases.

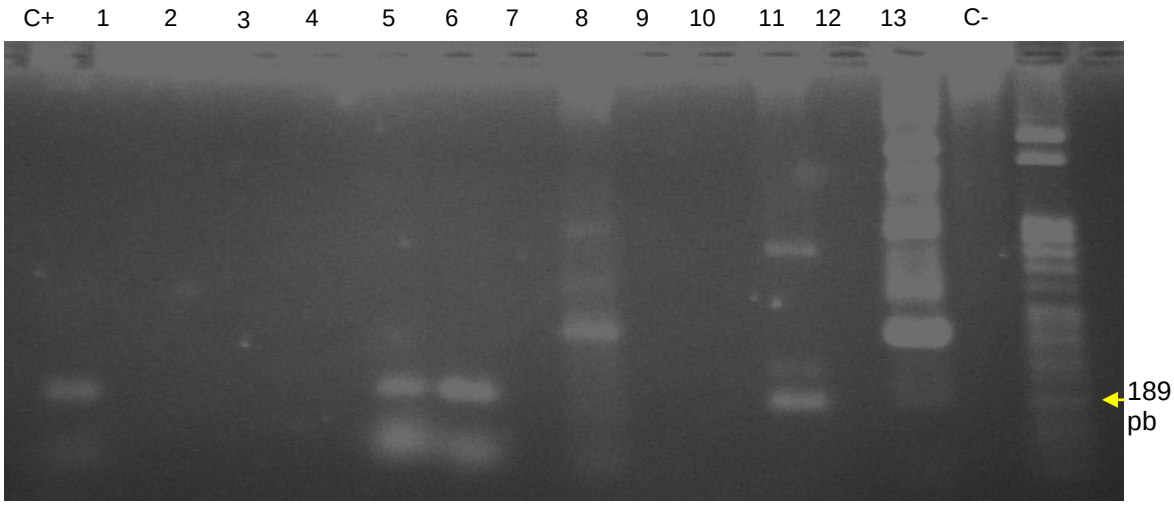

Figura 9: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR para detecção do gene *bla*$_{CTX}$ no DNA plasmidial dos isolados resistentes aos agentes betalactâmicos. Colunas 5, 6 e 11: amostras positivas; colunas 1 – 4; 7 – 10; 12 e 13: amostras negativas; C+: controle positivo (189 pb); C-: controle negativo da reação. Ponta da seta amarela: marcador de peso molecular de 50 pb.

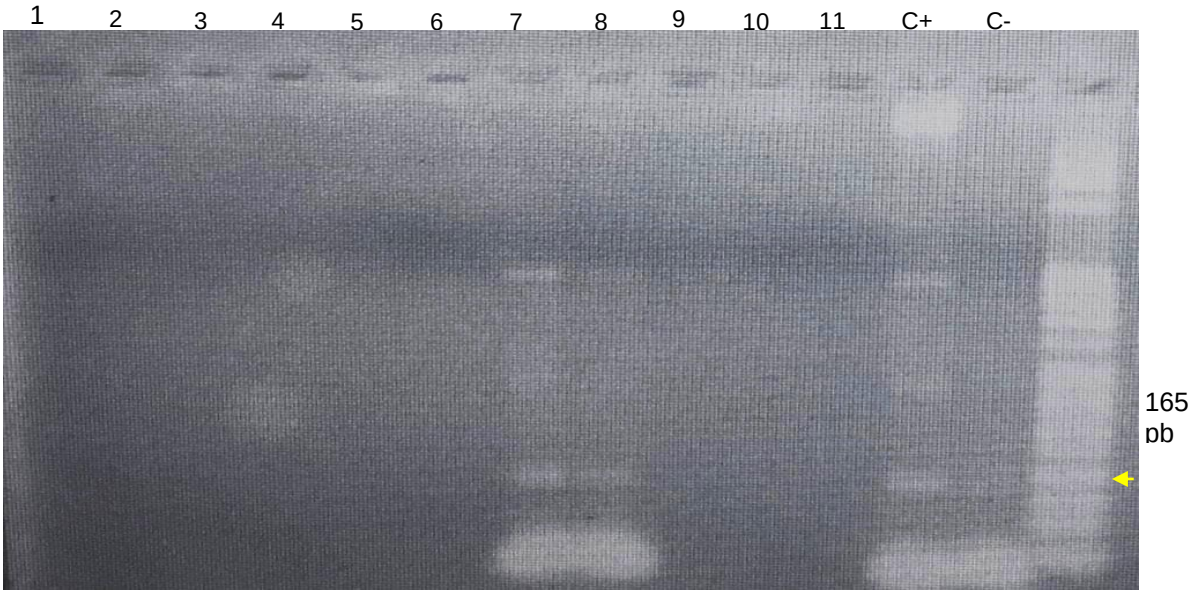

Figura 10: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR para detecção do gene *bla*$_{TEM}$ no DNA plasmidial dos isolados resistentes aos agentes betalactâmicos. Colunas 7 e 8: amostras positivas; colunas 1 – 6; 9 – 11: amostras negativas; C+: controle positivo (165 pb); C-: controle negativo da reação. Ponta da seta amarela: marcador de peso molecular de 50 pb.

6.5 ANÁLISE DOS PERFIS DE MACRORRESTRIÇÃO PARA *P. mirabilis*

Dos 107 isolados caracterizados como *P. mirabilis* que foram submetidos ao PFGE, 88 (88,2 %) foram tipáveis pela enzima *Xba*I. Dezenove isolados foram considerados não-tipáveis (NT) pelo PFGE usando a enzima *Xba*I. A Figura 11 mostra o dendrograma construído com base nos perfis de macrorrestrição obtidos.

A análise dos 88 isolados revelou elevada diversidade genética entre as cepas. Foi possível verificar oito *clusters* e três clones independentes. Para melhor descrição, os *clusters* foram designados com letras, A – H, e os clones foram designados com números, 1 – 3.

Os *clusters* C, D, E, F, G e H agruparam dois isolados provenientes de ônibus diferentes, tanto de barras verticais quanto horizontais. O *cluster* A agrupou 3 isolados, dos quais dois eram provenientes de ônibus diferentes e um

originado de uma plataforma. Já o *cluster* B agrupou um isolado originado de uma plataforma, geneticamente relacionado com um clone presente em barras verticais e horizontais de um mesmo ônibus. Os *clusters* observados não foram geneticamente relacionados.

Os clones independentes 1 e 2 contém dois isolados geneticamente idênticos provenientes de ônibus diferentes, envolvendo tanto barras verticais como horizontais. O clone 3 envolveu dois isolados, um proveniente da barra vertical de um ônibus e o outro da catraca de uma plataforma.

Ao comparar o perfil de suscetibilidade entre as cepas geneticamente relacionadas, observamos que uma cepa do *cluster* E foi caracterizada como MDR pelo TSA e ainda foi detectada o gene bla_{CTX}. Porém, a outra cepa presente nesse *cluster* apresentou sensibilidade aos antimicrobianos testados.

Com relação ao *cluster* A, as duas cepas com 91,4 % de similaridade genética foram classificadas como MDR, enquanto a outra cepa apresentou sensibilidade aos antimicrobianos testados.

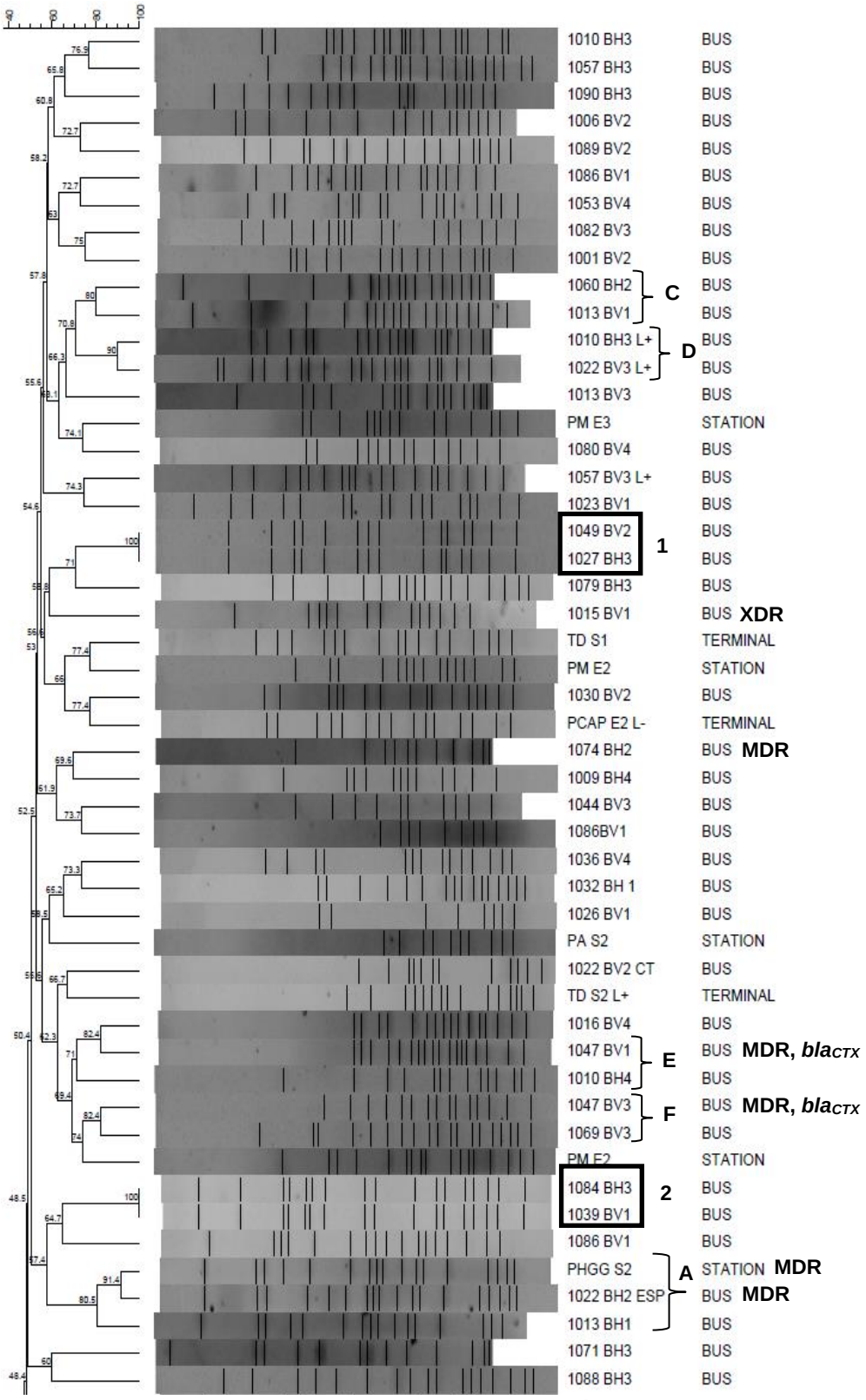

Figura 11 A: Dendrograma resultante da análise da comparação dos perfis de restrição dos *P. miraiblis* isolados das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e nas catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo no município de Goiânia – Go. A, C, D, E, F: *Clusters;* 1 e 2: clones

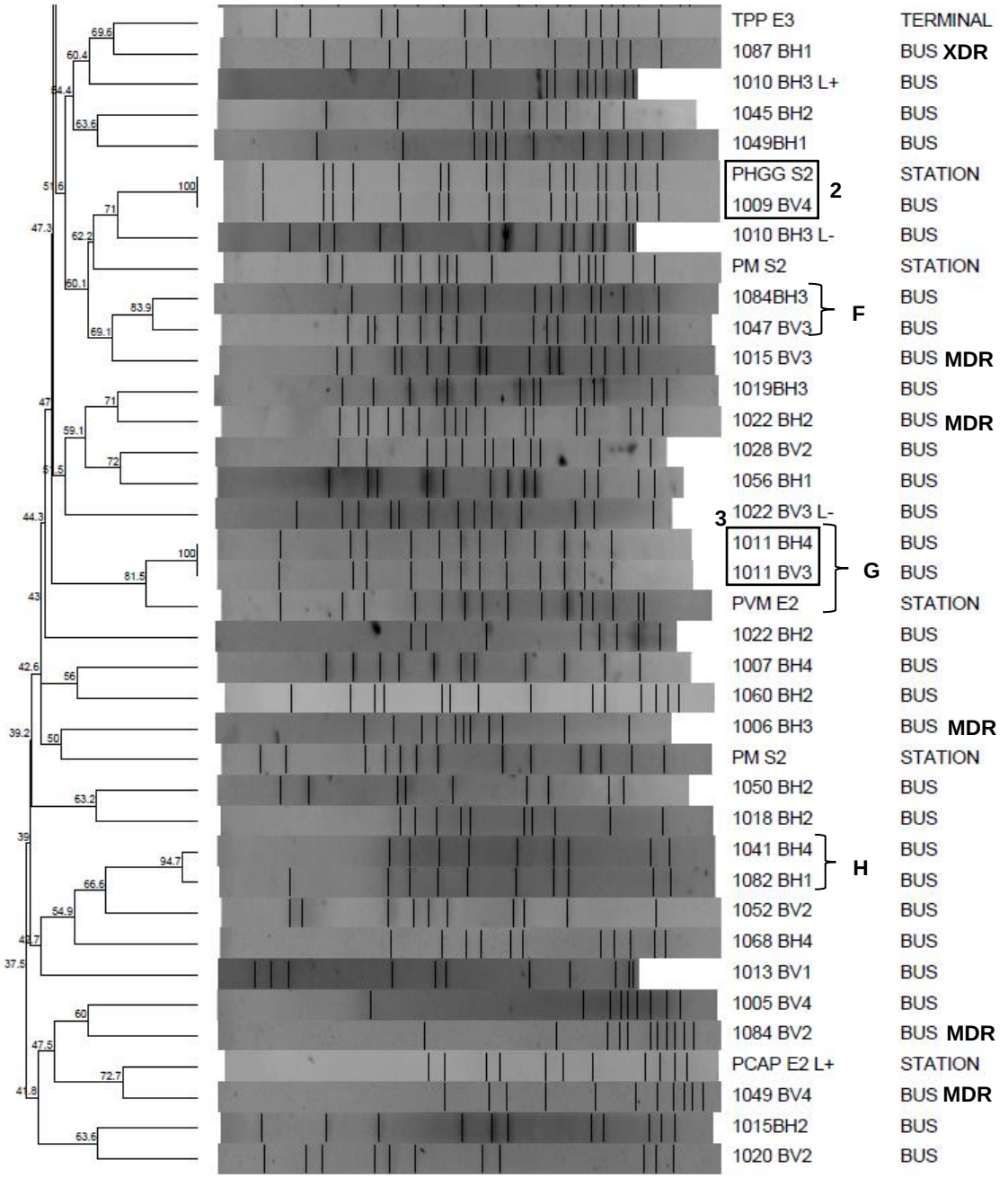

Figura 11 B: dendrograma resultante da análise da comparação dos perfis de restrição dos *P. mirabilis* isolados das barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus e nas catracas das plataformas e terminais da linha de transporte público coletivo no município de Goiânia – Go. B, G, H: *Clusters*; 3: clone.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo estimou a prevalência de bacilos Gram negativos contaminando as superfícies presentes em uma linha do sistema de transporte público coletivo, linha Leste-Oeste, do município de Goiânia – GO. A presença de bactérias contaminando fômites é bastante estudada (Gerhardts et al. 2012; Kramer et al. 2006; Angelakis et al. 2014), porém poucos estudos são realizados para caracterizar a dispersão e epidemiologia de bactérias e outros micro-organismos em superfícies presentes nos transportes coletivos. Este é o primeiro estudo a caracterizar genotipicamente os bacilos Gram negativos isolados em uma das mais importantes linhas de transporte coletivo da região.

Nosso estudo estimou que 46,0 % das superfícies analisadas estavam contaminadas por BGN. Acreditamos que essa elevada prevalência de BGN possa ser justificada pela elevada quantidade de passageiros utilizando esse sistema diariamente. Apesar desse estudo não ter avaliado a contaminação microbiológica das mãos dos usuários após a utilização desse sistema, podemos inferir que os usuários dessa linha de transporte coletivo do município têm um risco de 2,3 vezes em se contaminar por BGN, quando tocam as superfícies analisadas. Por serem frequentemente tocadas pelos passageiros, podemos deduzir que as superfícies presentes no sistema de transporte público coletivo compõem o modelo fômite-mão e mão-fômite.

Ainda, a característica de superfícies não porosas (aço) das catracas e das barras dos ônibus pode auxiliar na disseminação de bactérias. Já foi demonstrado em um estudo experimental que fômites não porosos são mais eficientes na transferência de bactérias dos fômites para as mãos do que fômites não porosos (Lopez et al. 2013).

A contaminação por BGN nas barras fixas horizontais e verticais presentes nos ônibus apresentou uma maior prevalência (49,0 %) (P = 0,0001) do que nas catracas das plataformas e terminais (29,5 %). Acreditamos que essa diferença possa ser justificada pela quantidade de passageiros presentes nos ônibus ser maior do que nas plataformas e terminais, o que pode influenciar na quantidade de vezes que as superfícies são tocadas e, consequentemente, contaminadas.

A influência da quantidade de passageiros na contaminação de superfícies também foi observada entre os períodos de coletas. As coletas realizadas entre 9 e 11 horas da manhã apresentaram uma maior positividade (46,0 %) em relação as coletas realizadas entre 14 e 17 horas da tarde (37,0 %). Pressupomos que essa diferença tenha ocorrido uma vez que as coletas no período matutino foram realizadas após o horário de pico de passageiros, enquanto que as coletas no período vespertino foram realizadas antes do horário de pico. Após o horário de pico as superfícies tendem a estar mais contaminadas devido ao elevado número de passageiros que mantiveram contato.

Nesse contexto, Murta e Massara (2009) realizaram uma pesquisa sobre contaminação por ovos de helmintos intestinais no sistema de transporte público coletivo da cidade de Belo Horizonte – MG, Brasil. Nessa pesquisa, os autores compararam a prevalência de ovos de *Oxyuridae, Hymenolepsis sp.* e *Ascaridae* em três grandes estações de embarque e desembarque da capital. As duas estações com maior número de passageiros por dia (61.063 e 99.733 passageiros/dia) apresentaram maior contaminação por ovos de helmintos em catracas do que a estação com menor quantidade de passageiros por dia (39.998 passageiros/dia).

Os autores também avaliaram a contaminação por parasitas em corrimãos e assentos presentes em 30 ônibus em circulação. Nesses, constataram que 100, 0 % dos ônibus avaliados estavam contaminados por pelo menos um dos ovos de helmintos. Além disso, os corrimãos foram considerados as superfícies com maior prevalência de contaminação, com prevalência de 53,1% em relação aos assentos (31,6 %) (Murta & Massara, 2009). Borges e colaboradores (2009) também encontraram ovos de parasitas intestinais em assentos e catracas presentes em 3 (18,7 %) dos 16 ônibus analisados na cidade de Uberlândia – Minas Gerais, Brasil.

A contaminação bacteriana em transportes públicos coletivos foi estimada por Rodrigues e colaboradores (2006). Nesse estudo, os autores isolaram e identificaram várias espécies bacterianas, em barras fixas de ônibus do transporte coletivo em Curitiba – PR, Brasil. Foram identificadas as espécies *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus* e também várias enterobactérias como *Citrobacter freundii, Enterobacter aerogenes, Serratia*

liquefaciens, Salmonella Typhi, *E. coli* e *H. alvei*. Ainda concluíram que os ônibus que realizavam rotas inter-hospitais demonstraram o dobro de contaminação por micro-organismos em relação aos ônibus que realizavam outras rotas. Apesar dessa diferença, os autores não caracterizaram o perfil de multirresistência das bactérias isoladas.

Nossos resultados podem ser relacionados com outros estudos que também estimaram a presença de bactérias no sistema de transporte público coletivo em outros países. Lutz e colaboradores (2014), nos Estados Unidos, isolaram *S. aureus* em 68,0 % das superfícies presentes analisadas, tais como, assentos, encostos e corrimãos. Adicionalmente, Conceição e colaboradores (2013), em Lisboa, isolaram *S. aureus* em superfícies como assentos, corrimãos, botões de parada e máquinas de passaporte, em 36,2 % dos ônibus em estudo.

Esses estudos podem ser comparados ao presente trabalho, evidenciando os seres humanos como principais disseminadores de micro-organismos patogênicos para as superfícies presentes no sistema de transporte público coletivo das grandes cidades do Brasil. Algumas das espécies bacterianas isoladas em nosso estudo, como *E. coli*, *H. alvei* e *P. mirabilis*, pertencem a família *Enterobacteriaceae*. Essas espécies compõem a microbiota intestinal (Giske et al. 2008) e são indicadores de condições higiênico-sanitárias. Portanto, ambientes contaminados por essas bactérias podem evidenciar condições higiênicas inadequadas e ineficácia na desinfecção dessas superfícies (Rodrigues et al., 2006). Além disso, devido ao seu potencial patogênico, a presença de enterobactérias neste ambiente é relevante na compreensão dos fômites em veicular bactérias causadoras de infecções na comunidade.

Mesmo que a capacidade das enterobactérias em permanecer viáveis contaminando fômites e de se disseminarem entre pessoas e ambientes ter sido fundamentada por vários estudos (Kramer et al. 2006; Bloomfield et al. 2007 Gerhardts et al. 2011; Lopez et al. 2013), poucos trabalhos são realizados para mostrar o potencial que o sistema de transporte público possui em disseminar esse grupo de bactérias. O sistema de transporte público coletivo pode auxiliar na transmissão de enterobactérias, pois os ônibus trafegam realizando ligação entre bairros, escolas, instituições de saúde, restaurantes e outros ambientes comunitários urbanos.

Em nossos resultados verificamos a presença de 115 (29,3 %) *H. alvei* contaminando as superfícies estudadas. A contaminação por essa bactéria em sistema de transporte público coletivo também foi evidenciada em 10,0 % das enterobactérias isoladas por Rodrigues e colaboradores (2006) em Curitiba. A disseminação de *H. alvei* também já foi relacionada a insetos vetores capturados em um hospital em Goiânia – GO (Prado et al. 2002). Já foi demonstrado que *H. alvei* possui habilidade de formar biofilme e assim, aumentar sua aderência, tanto em superfícies ambientais abióticas quanto nas células epiteliais (Vivas et al. 2008).

Porém, são poucos os estudos que consideram importantes o isolamento e identificação dessa bactéria. Muitas vezes, mesmo quando isoladas em espécimes clínicos, não é relatada como agente causador de infecção (Stanic et al. 2015). As subnotificações de *H. alvei* sustentam um viés na epidemiologia dessa bactéria (Schuchat et al. 2001, Laupand et al. 2006) e dificulta a correlação dos resultados encontrados neste estudo.

Contudo, alguns estudos mostram seu potencial patogênico em pacientes com sistema imunológico debilitado, sobretudo em pessoas transplantadas (Savini et al. 2008; Stanic et al. 2015). A presença dessa bactéria nos fômites do sistema de transporte público coletivo não deve ser desconsiderada, uma vez que existe uma tendência demográfica para envelhecimento da população e aumento de pessoas com sistema imunológico debilitado e ignorar a presença dessa bactéria pode ser alarmante para esse grupo de risco (Laupand et al. 2006).

Dentre os 392 bacilos Gram negativos isolados, *A. baumannii* foi a espécie mais prevalente (41,0 %) encontrada contaminando fômites da linha Leste-Oeste. Essa informação sustenta a hipótese discutida por Morgan e colaboradores (2012) que a espécie *A. baumannii* é disseminada com mais frequência do que as outras bactérias utilizadas em seu estudo (*S. aureus, Enterococcus spp* e *P. aeruginosa*). Portanto, *A. baumannii* possui uma tendência em se dispersar contaminando mãos, roupas e os fômites presentes no ambiente (Morgan et al. 2012). Entretanto, o autor sugere que são necessárias pesquisas adicionais para explorar quais as características que o *A. baumannii* possui para se dispersar mais do que outras bactérias.

Acreditamos que alguns fatores podem explicar a persistência de *A. baumannii* em fômites. A presença dessa bactéria como parte da microbiota da orofaringe, pele e mucosas pode contribuir com sua disseminação no ambiente (Fournie & Richet 2006). O clima tropical e úmido da cidade de Goiânia – GO também pode influenciar na elevada incidência de *A. baumannii*. Alguns estudos mostram que grande parte das infecções causadas por essa bactéria na comunidade ocorrem nos meses mais quentes do ano (Christie et al. 1995; Molina et al. 2010; Choi et al. 2012; Oh et al. 2013) e pessoas com infecção podem ser reservatórios desse micro-organismo, e contribuir com a disseminação e contaminação do ambiente (Denton et al. 2004).

Outra possível razão quanto à persistência de *A. baumannii* no ambiente é a habilidade que essa espécie possui em formar biofilme. Assim, a célula pode permanecer metabolicamente inativa e resistir ao estresse ambiental (Tomaras et al. 2003; Roberts & Stewart 2005; McQueary & Actis 2011; e Gayoso et al. 2014). Consequentemente, essa bactéria é capaz de sobreviver em superfícies secas durante vários dias, devido à sua capacidade de resistir à dessecação. O biofilme ainda dificulta a remoção das bactérias durante a higienização do ambiente, pois promove resistência aos agentes desinfetantes (Peleg et al. 2008). Portanto, apesar das superfícies das barras fixas dos ônibus e das catracas de plataformas e terminais serem superfícies secas, nossos resultados mostram que *A. baumannii* consegue contaminar e permanecer nesse ambiente.

O papel do ambiente comunitário atuando como reservatório de cepas de *A. baumannii* é pouco explorado (Zeana et al. 2003). A espécie *A. baumannii* é frequentemente associada com contaminação de superfícies, porém os estudos que relacionam *A. baumannii* contaminando fômites são limitados ao ambiente hospitalar. Várias pesquisas evidenciaram essa bactéria contaminando superfícies presentes em UTI, por exemplo, equipamentos de ventilação mecânica, recipientes de água destilada, equipamentos de nutrição, eletrocardiograma, entre outros (Hota 2004; Paterson 2006; Ulger et al. 2015). Entretanto, a presença desse micro-organismo contaminando fômites que são frequentemente tocados é um dado importante, pois indica a sobrevivência dessa bactéria em ambientes diversos e não apenas nas instituições de saúde.

A colonização/contaminação por *A. baumannii* predispõem a infecção contribuindo com o aumento da mortalidade e morbidade, principalmente em

pessoas que fazem uso excessivo de álcool, fumantes, diabéticos e portadores de doenças crônicas pulmonares (Anstey et al. 2002; Nwugo et al. 2012).

Nossos resultados também mostraram que 67,0 % dos isolados de *A. baumannii* foram sensíveis aos antimicrobianos testados. Além disso, nenhum dos isolados foi caracterizado como MDR. Ao contrário do que é frequentemente relatado nos estudos sobre *A. baumannii* de origem hospitalar, essa espécie com origem na comunidade raramente é considerada multirresistente (Davis et al. 2014). Dessa maneira, são usualmente sensíveis aos aminoglicosídeos, penicilinas de espectro estendido associadas aos inibidores de betalactamases, ceftazidima, fluoroquinolonas e carbapenêmicos (Chen et al. 2001; Zeana et al. 2003, Leung et al. 2006).

Essa suscetibilidade aos antimicrobianos mostrada pelo *A. baumannii* isolados está de acordo com um estudo realizado por Greene e colaboradores (2015). Esses autores sugeriram que o fenótipo de MDR em *A. baumannii* depende das condições ambientes nas quais a espécie se encontra. Nesse estudo foram avaliados a formação de biofilme, tolerância à dessecação e resistência a antimicrobianos, em 115 cepas isoladas em amostras clínicas e 30 cepas isoladas em fômites. Os autores concluíram que a expressão de biofilme é importante para a sobrevivência da espécie em amostras clínicas, mas revelou-se criticamente importante no ambiente, evitando a dessecação. E ainda, que o fenótipo MDR foi significativamente mais observado em amostras clínicas em relação as espécies encontradas em fômites. Apesar do nosso estudo não ter avaliado a expressão de biofilme, acreditamos que as cepas de *A. baumannii* não apresentaram o fenótipo MDR por terem sido isoladas no ambiente.

Contudo, em pacientes com origem comunitária, é comum detectar resistência a antimicrobianos frequentemente utilizados no tratamento de infecções por *A. baumannii* (Dexter et al. 2015), como por exemplo, à cefalosporina de terceira geração, ceftriaxona (Falagas et al. 2007). Esse dado pode ser comparado com nossos achados uma vez que 31,0 % dos *A. baumannii* isolados apresentaram resistência à ceftriaxona.

No entanto, outras espécies isoladas das superfícies do sistema de transporte público coletivo apresentaram os perfis MDR e XDR. As espécies *P. mirabilis, E. coli* e *H. alvei* apresentaram resistência a pelo menos um agente

antimicrobiano em três ou mais classes de antimicrobianos, sendo consideradas como MDR. Três isolados de *P. mirabilis* apresentaram sensibilidade apenas a duas classes (aminoglicosídeo e carbapenêmico), sendo então caracterizados como XDR (Magiorakos et al. 2012). A prevalência de 8,8 % de bactérias multirresistentes entre os BGN isolados nessa linha de transporte público proporciona um risco de 4,2 vezes de contaminação por um BGNMDR entre os passageiros.

A presença dessas bactérias colonizando fômites veiculados na comunidade é um dado importante uma vez que esse perfil de bactérias é considerado uma preocupação específica das instituições de saúde. O contato com fômites contaminados por bactérias MDR ou XDR pode favorecer a colonização do indivíduo (Scott 2013). Admitindo que a colonização por bactérias pode predispor o desenvolvimento de infecção, consequentemente estar colonizado por bactérias com perfil MDR ou XDR pode complicar o tratamento de infecções, uma vez que limita as opções terapêuticas (Pitout & Laupand, 2008).

Acrescenta-se que um dos *P. mirabilis* com perfil MDR tinha origem em uma plataforma a qual abastece um grande hospital em Goiânia – GO. Acreditamos que o fato dos ônibus trafegarem próximo as instituições de saúde possa contribuir para a disseminação de bactérias MDR para os outros ambientes comunitários urbanos. Essa hipótese também foi discutida por Conceição e colaboradores (2013) e por Lutz e colaboradores (2014). Esses autores isolaram MRSA das superfícies presentes em ônibus que percorriam rotas próximo a hospitais em Portugal e nos Estados Unidos, respectivamente.

Allen e colaboradores (1997) também demonstraram o ambiente hospitalar como origem de disseminação de bactérias MDR para outros ambientes. Após uma enfermeira, o marido e o filho serem colonizados por MRSA, os objetos presentes em sua residência também estavam contaminados. Os autores observaram que MRSA estava presente contaminando tapetes, roupas de cama, travesseiros, cortinas, móveis e roupas da família. A presença de bactérias MDR também foi evidenciada em veículos de emergências médicas (Eibicht & Vogel, 2011). Após o transporte de pacientes colonizados por MRSA, os autores verificaram que 9,0 % das cabines analisadas passaram a estar contaminados por essa bactéria. Esses veículos trafegam por várias regiões e

entre hospitais, e também transportam pacientes em diferentes estados de saúde, além de paramédicos e acompanhantes. Consequentemente esses veículos, assim como os ônibus, podem ser reservatórios e disseminadores de bactérias MDR para a comunidade.

Outros estudos também relacionaram a dispersão de bactérias MDR entre pessoas e fômites. Ustun e Cihangiroglu (2013) investigou se o uso de celulares dentro de um hospital na Turquia por trabalhadores da saúde (enfermeiros, laboratoristas e médicos) poderia resultar em contaminação do dispositivo por bactérias MDR. Os autores concluíram que 11,2 % dos celulares avaliados estavam contaminados por *E. coli* MDR. Desse modo, celulares de trabalhadores da saúde podem ser reservatórios de bactérias MDR e ser responsáveis pela disseminação desse perfil bacteriano em pacientes e em outros cenários comunitários urbanos fora do hospital (Ustun & Cihangiroglu 2013).

Em um hospital universitário em Jerusalém foram realizadas coletas nas superfícies de equipamentos de radiografia durante um ano para observar a contaminação bacteriana desse equipamento. Durante esse período, os autores constataram que 39,0 % das superfícies do equipamento estavam contaminadas por vários BGNMDR, como *A. baumannii, K. pneumoniae, P. aeruginosa* e *S. maltophilia*. Também observaram que as espécies encontradas no equipamento eram geneticamente relacionadas com as espécies coletadas em amostras clínicas de pacientes no mesmo período (Levin et al. 2009).

A maioria das pesquisas com BGNMDR são limitadas a equipamentos médicos ou superfícies frequentemente tocadas no ambiente hospitalar. A contaminação das superfícies hospitalares por BGNMDR pode aumentar o risco de colonização dos pacientes e os profissionais da saúde são os principais responsáveis pela contaminação cruzada entre eles (Longtin et al. 2011). Entretanto, nossos resultados mostraram que os BGNMDR também estão presentes contaminando fômites em outros ambientes comunitários, fora das instituições de saúde.

Nosso estudo almejou caracterizar genotipicamente a produção de betalactamases e carbapenemases pela detecção de genes que conferem resistência aos antimicrobianos betalactâmicos. Apenas os genes bla_{CTX} e bla_{TEM} foram detectados em um total de cinco isolados. Contudo, esse resultado

era esperado, uma vez que os testes fenotípicos realizados não demonstraram a indução das enzimas betalactamases, betalactamases tipo AmpC e carbapenemases. Acreditamos que a ausência dos genes codificadores de betalactamases nos plasmídeos extraídos ocorra pela ausência de pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos no ambiente comunitário.

Na ausência de genes codificadores de betalactamases, outros mecanismos que envolvem a multirresistência aos antimicrobianos podem estar presentes. Nas bactérias Gram negativas podem ocorrer mutações na região do cromossomo que regula a expressão da bomba de efluxo, resultando em super expressão desse mecanismo (Coyne et al. 2011). A bomba de efluxo como promotora da resistência bacteriana já foi encontrada em vários BGN, como *E. coli, A. baumannii* e *P. mirabilis* (Blair et al. 2014). Esse mecanismo consiste em carregar as moléculas de antimicrobianos para fora da célula, diminuindo sua concentração intracelular. Outros mecanismos que conferem resistência aos antimicrobianos também podem ocorrer, como alteração da região alvo, expressão de proteínas ligantes a penicilina e diminuição da permeabilidade da membrana externa (Kumar & Schweizer 2005, Siroy et al. 2006; Peleg et al. 2008).

Os genes bla_{CTX} e bla_{TEM} podem estar localizados nos plasmídeos e codificam as enzimas betalactamases. As betalactamases encontradas nesse estudo possuem as variações TEM e CTX e pertencem a classe A de Ambler (1980). As características fenotípicas dessas bactérias observadas no TSA (penicilina, ceftriaxona, cefepime, aztreonam resistentes e amoxicilina + ácido clavulânico/piperacilina + tazobactam sensível) foram correspondentes às características esperadas pelas betalactamases classe A. Essas enzimas hidrolisam as penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Além disso, são inibidas pelos inibidores de betalactamases (Gniadkowski 2001).

A presença dos genes codificadores de betalactamases também já foi detectada por outros autores. Pantel e colaboradores (2015), em um hospital na França, comparou geneticamente as cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase encontradas em 5 pacientes e em 2 fômites presentes no hospital. Os autores detectaram a presença do gene bla_{OXA-48} nas cepas de *K. pneumoniae* isoladas tanto em pacientes quanto nas cepas encontradas

contaminando pias e colchões e ainda que constataram relações de similaridade geneticamente entre elas.

Recentemente, a ocorrência de resistência antimicrobiana no ambiente passou a ser frequentemente evidenciada (Williams et al 2016). Ambientes aquáticos, como água do mar próximo as praias, e piscinas podem ser fontes disseminadoras de resistência antimicrobianas. Já foram detectados genes de betalactamases do tipo *bla*$_{CTX}$ e *bla*$_{TEM}$ em enterobactérias isoladas a partir de amostras de água do mar, utilizada como recreação na Croácia (Maravic et al 2015). As estações de tratamento de águas residuais também já foram relacionadas como fontes disseminadoras de *E. coli* e outras bactérias Gram negativas, carregando genes de betalactamases tipo CTX (Zhang et al. 2015).

Na cidade do Rio de Janeiro, Brasil amostras de água do mar de vários pontos diferentes da cidade, foram coletadas para investigar se as águas costeiras estavam contaminadas por BGNMDR. Nesse estudo, os autores identificaram em diferentes pontos de coleta, as espécies *K. pneumoniae* e *Enterobacter spp*. portadores do gene *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{CTX,}$ *bla*$_{SHV,}$ e também os genes carbapenemases *bla*$_{KPC}$ e *bla*$_{GES}$ (Montezzi et al. 2015).

Esses estudos, assim como nossos resultados constataram a presença dos genes *bla*$_{CTX}$ e *bla*$_{TEM}$ em cepas encontradas contaminando fômites em ambientes comunitários, indicando que os fômites podem ser reservatórios de bactérias MDR e XDR que carregam genes produtores de betalactamases (Kramer et al. 2006). Esses genes podem ser transferidos por interações bacterianas e se disseminar entre as bactérias presentes no ambiente (Williams et al. 2016).

A presença da bactéria *H. alvei,* com perfil MDR e carregando genes codificadores das betalactamases do tipo CTX e TEM foi observada em nosso estudo. Contudo, não foram encontrados estudos que também detectaram a presença desses genes em *H. alvei* na comunidade. Acreditamos que a carência nas notificações possa estar compromentendo a avaliação epidemiológica dessa espécie. Sabe-se que essa espécie possui um gene o qual codifica uma betalactamases tipo AmpC, a qual resulta em resistência às cefalosporinas de terceira geração (Nadjar et al. 2000). Essa informação corrobora com nossos resultados uma vez que 21 isolados foram resistentes a ceftazidima e 48 foram resistentes a ceftriaxona. Nós demonstramos que *H. alvei* MDR pode ser

comumente encontrada em fômites comunitários evidenciando sua contaminação nos sistemas de transporte público coletivo da linha Leste-Oeste. Sendo assim, são necessários mais estudos que sustentem sua epidemiologia na comunidade.

Nós avaliamos os perfis de macrorrestrição dos *P. mirabilis* isolados. Os resultados do PFGE mostraram uma alta diversidade genética entre as cepas analisadas e também a presença de oitos *clusters*, os quais não são geneticamente relacionados. Observamos também a formação de seis *clusters* (C, D, E, F, G e H) com cepas geneticamente relacionadas de ônibus diferentes e plataformas. A presença de cepas de *P. mirabilis* geneticamente relacionadas em ônibus diferentes e entre ônibus e plataformas evidencia que essas espécies possuem potencial de dispersão entre diferentes ambientes.

Nossos resultados também apontaram a formação de um *cluster* (A) constituído por três cepas, sendo que duas compartilham o mesmo perfil MDR, no entanto, a outra cepa, apresentou sensibilidade aos antimicrobianos testados. Pressupomos que essa diferença no perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos ocorra uma vez que as cepas MDR apresentaram ser mais próximas geneticamente, com 91,4 % de similaridade do que a cepa suscetível, com 80,5 % de similaridade. O *cluster E* também nos apontou que uma das cepas MDR foi originada de uma plataforma que abastece um grande hospital em Goiânia – GO.

A presença de cepas MDR com possível origem em ambiente hospitalar, pode ser comparada a um estudo sobre contaminação bacteriana em superfícies de ônibus em Portugal, realizado por Conceição e colaboradores (2013). Esses autores observaram que as mesmas cepas MRSA encontradas contaminando superfícies dos ônibus estudados, eram geneticamente relacionadas com cepas MRSA encontradas em vários hospitais em Portugal. Com essas informações, inferimos que cepas MDR possuem uma tendência de dominância e dispersão para outros ambientes.

Os resultados do PFGE também exibiram a presença de três clones circulando na linha Leste-Oeste. Observamos que os isolados que constituem esses clones foram coletados em datas diferentes, com intervalos de até quatro meses de coletas de um para o outro. Portanto, além da capacidade de dispersão no ambiente, a presença desses clones também indica a persistência

de *P. mirabilis* durante vários meses em fômites. Esse dado correlaciona com estudos realizados por Kramer e colaboradores (2006), o qual discute que as bactérias Gram negativas podem permanecer durante meses colonizando superfícies inanimadas.

O clone 3 é formado por duas cepas, uma cepa originada das barras dos ônibus e a outra cepa originada da mesma plataforma onde foi encontrado o *cluster* A. Apesar do clone 3 e do *cluster* A não serem relacionados geneticamente, ambos possuem cepas originadas da plataforma próxima a um hospital. O *cluster* E também nos chamou a atenção por ser formado por uma cepa MDR e ainda por carregar o gene bla_{CTX} em seu DNA plasmidial. Acreditamos que essas cepas com possível origem hospitalar e as cepas com perfil MDR possuem uma tendência de dominância no ambiente e potencial de dispersão em ambientes hospitalares e deste para outros sítios comunitários. A persistência dessas bactérias no ambiente pode ser precursora em originar surtos de contaminação e infecção (Luzzaro et al. 2009).

Desse modo, a análise de macrorrestrição entre as cepas de *P. mirabilis* revelou que algumas linhagens tendem a ser dispersar no ambiente. Nossas análises podem ser comparadas ao estudo realizado por Luzzaro e colaboradores (2009). Esses autores identificaram clones de *P. mirabilis* colonizando pacientes internados no mesmo hospital e também colonizando pacientes de hospitais diferentes, e também os residentes que assistiam esses pacientes.

Portanto, mesmo nosso estudo sendo realizado em âmbito comunitário, foi possível verificar que pode ocorrer similaridade genética entre as cepas disseminadas nos fômites presentes no sistema de transporte público coletivo do município de Goiânia-GO.

8 CONCLUSÕES

Nosso estudo demonstrou a presença de BGN (46,0 %) contaminando uma importante linha de transporte público coletivo da cidade de Goiânia – GO. Portanto, é um ambiente de grande relevância para o estudo da epidemiologia microbiana associada à contaminação das superfícies em ambientes comunitários.

Nosso estudo comprovou a presença de BGNMDR (7,9 %) contaminando superfícies frequentemente tocadas dentro dos ônibus, plataformas e terminais. Com essas informações concluímos que a preocupação com bactérias MDR e XDR deixa de ser um problema exclusivo das instituições de saúde, uma vez que esses ambientes não são isolados da comunidade. Sendo assim, sugerimos mais estudos epidemiológicos que reforcem a presença de BGNMDR nos mais diversos ambientes comunitários urbanos.

Adicionalmente, os ônibus que trafegam próximo as instituições de saúde pode estar auxiliando na disseminação desses patógenos para outros ambientes comunitários. Sendo assim, aumenta-se a chance de uma pessoa se contaminar com essas bactérias.

Apesar das análises do perfil de macrorrestrição realizadas por PFGE não terem demonstrado predominância de algum clone específico, verificamos a tendência de dominância de algumas cepas geneticamente relacionadas, principalmente as cepas MDR. A presença de *clusters* e clones no ambiente certificam a capacidade dos BGN em se disseminar por vários ambientes e persistir contaminando fômites. Portanto, é necessário a elaboração de diretrizes que possam diminuir as chances desses BGN se disseminarem no ambiente.

REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Detecção e identificação de bactérias de importância médica. Módulo VI p. 14-40. 2010a.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Enzima KPC: entenda o que é. 22 Out 2010b.

Aitken C, Jeffries DJ. Nosocomial spread of viral disease. *Clin Microbiol Rev* 14:528–546, 2001.

Allen KD, Anson JJ, Parsons LA, Frost NG. Staff carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus (EMRSA 15*) and the home environment: a case report. *J Hosp Infect* 35:307-311, 1997.

Ambler R. The structure of beta-lactamases*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 289: 321-331, 1980.

Ambler RP, Coulson AFW., Fre´re JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, Le´vesque RC, Tiraby G. WaleySG. A standardnumbering scheme for the class A betalactamases. *Biochem J* 276:269–272, 1991.

Angelakis E, Azhar EI, Bibi F, Yasir M, Al-Ghamdi AK, Ashshi AM, Elshemi A. G, Raoult D. Paper Money and coins as potential vectors of transmissible disease. *Future Microbiol* 9:249-261, 2014.

Anstey NM, Currie BJ, Hassell M, Palmer D, Dwyer B, Seifert H. Community-Acquired Bacteremic *Acinetobacter* Pneumonia in Tropical Australia Is Caused by Diverse Strains of *Acinetobacter baumannii*, with Carriage in the Throat in At-Risk Groups. *J Clin Microbiol* 40(2): 685-686, 2002.

ANVISA - COMUNICAÇÃO DE RISCO NO 001/2013 - GVIMS/GGTES-ANVISA. Circulação de microrganismos com mecanismo de resistência denominado "New Delhi Metalobetalactamase" ou NDM no Brasil.

Baker J, Vipond IB, Bloomfield SF. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of *norovirus* contamination via environment surfaces. *J Hosp Infect*. 58:42-49, 2004.

Baker J. Bloomfield SF. Survival of *Salmonella* in bathrooms and toilets in domestic homes following salmonellosis. *J Appl Microbiol* 89: 137–144, 2000.

Bale MJ, Bennett PM, Benninger JE, Hinton M: The survival of bacteria exposed to dessication on surfaces associated with farm buildings. *J of App Bacteriol* 75:519-528, 1993.

Banu A, Anand M, Nagi N. White coats as a vehicle for bacterial dissemination. *J Clin Diagn Res* 6:1381-1384, 2012.

Barker J. The role of viruses in gastrointestinal disease in the home. *J Infect* 43:42–44, 2001.

Beirão EM, Furtado JJD, Filho RGHF, Gales A C Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. *Braz j Infect. Dis* 15:69-73, 2011.

Bhoonderowa A, Gookool S, Biranjia-Hurdoyal SD. The importance of mobile phones in the possible transmission of bacterial infections in the community. *J Commun Health* 39:965-967, 2014.

Blair JMA, Richmond GE, Piddock LJV. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiol* 9(10)1165–1177, 2014.

Bloomfield SF, Aiello AE, Cookson B, O´Boyle C, Larson EL. The effectiveness of hand hygiene procedures in reducing the risks of infections in home and community settings including handwashing and alcohol-based hands sanitizers. *Am J Infect Control* 35(10):S27-S64, 2007.

Bloomfield SF, Exner M, Signorelli C, Nath KJ, Scott EA. The chain of infection transmission in the home and everyday life settings, and the role of hygiene in

reducing the risk of infection. International Scientific Forum on Home Hygiene. 2012.

Bloomfield SF, Scott EA. A risk assessment approach to use of antimicrobials in the home to prevent spread of infection. *Am J Infect Control* 41:S87-S93, 2013.

Bonnet R, Sampaio JLM, Labia R, De Champs C, Sirot D, Chanal C, Sirot JA novel CTX-M betalactamase (CTX-M-8) in cefotaxime resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Ch* 44:1936–1942, 2000.

Bonnet R. Growing group of extend-spectrum betalactamases: the CTX-M enzymes – Minireviews. *Antimicrob Agents Ch* 48: 1-14, 2004.

Boone SA, Gerba CP. Significance of fomites in the spread of respiratory and enteric viral disease. *Appl Environ Microbiol* 73:1687–1696, 2007.

Boone SA, Gerba CP. The prevalence of human *parainfluenza virus 1* on *indoor* office fomites. *Food Environ Virol* 2:41–46, 2010.

Borges CA, Costa-Cruz JM, DE PAULA FM. Brief communication: intestinal parasites inside public restrooms and buses from the city of Urbelândia, Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med trop S. Paulo* 51(4): 223 – 225, 2009.

Boyce JM. Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. *J Hosp Infect*65:50-54, 2007.

Bright KR, Boone SA, Gerba CP. Occurrence of bacteria and viruses on elementary classroom surfaces and the potential role of classroom hygiene in the spread of infectious diseases. *J Sch Nurs* 26:33–41, 2010.

Brown DQ. Disposable vs reusable electrocardiography leads in development of and cross-contamination by resistant bacteria. *Crit Care Nurse* 31(3):62–68, 2011.

Cardoso AM, Reis C. Contaminação de superfícies inanimadas de UTI por bactérias Gram negativas multirresistentes em hospital universitário de Goiânia, GO. RBAC 48(3): 55-58, 2016.

Carriço JA, Pinto FR, Simas C, Nunes S, Sousa NG, Frazão N, de Lencastre H, Almeida JS. Assessment of Band-Based Similarity Coefficients for Automatic Type and Subtype Classification of Microbial Isolates Analyzed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J Clin Microbiol* 43(11):5483-5490, 2005.

Carratalá J, Mykietiuk A, Fernández-Sabé N, Suárez C, Dorca J, Verdaguer R, Manresa F, Gudiol F. Health care-associated pneumonia requiring hospital admission: epidemiology, antibiotic therapy, and clinical outcomes. *Arch Intern Med* 167:1393-1399, 2007.

Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrob Agents Ch* 55:1274–1278 2011.

Chen MZ, Hsueh PR, Lee LN, Yu CJ, Yang PC, Luh KT. Severe Community-Acquired Pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*. *CHEST* 120:1072–1077, 2001.

Choi JY, Kim Y, Ko EA. *Acinetobacter* species isolates from a range of environments: species survey and observations of antimicrobial resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis* 74(2):177-180, 2012.

Christie C, Mazon D, Hierholzer J, Patterson JE. Molecular heterogeneity of acinetobacter baumanii isolates during seasonal increase in prevalence. *Infect Control Hosp Epidemiol* 16(10): 590-594, 1995.

Centers for Disease Control and Prevention – Garner JS, Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee, eds. Guidelines for isolation precautions in hospitals, 1996. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1:53-80, 1996.

Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Suscetibility Testing: 26th Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100S26E, 2016.

Cogan TA, Bloomfield SF, Humphrey TJ. The effectiveness of hygiene procedures for the prevention of cross contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen. *Lett Appl Microbiol* 29:354-8,1999.

Conceição T, Diamantino F, Coelho C, de Lencastre H, Aires de SM. Contamination of Public Buses with MRSA in Lisbon, Portugal: a possible transmission route of major MRSA clones within the community.*Plos One8*:778-782, 2013.

Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo betalactamases: a last frontier for betalactams? *Lancet Infect Dis* 11:381-393, 2011.

Coyne S, Courvalin P, Perichon B. Efflux mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter spp*. *Antimicrob. Agents Chemother* 55(3):947–953, 2011.

Cozad A, Jones RD. Disinfection and the prevention of infectious disease. *Am J Infect* Control 31:243–254, 2003.

Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance*. Microbiol Mol Biol Rev*74: 417-433, 2010.

Davis JS, McMillan M, Swaminathan A. A 16-year prospective study of community-onset bacteremic *Acinetobacter* pneumonia: low mortality with appropriate initial empirical antibiotic protocols. *Chest* 146(4):1038-1045, 2014.

De Oliveira RA, Gales AC, da Silva RC, Filho JRC. Descrição e caracterização molecular de metalo-betalactamase SPM-1 em linhagens clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* em Goiânia, Brasil. *Perspect Med* 25: 11-19, 2013.

Denton M, Wilcoxa MH, Parnellc P, Greenc D, Keera V, Hawkeya PM, Evansd I, Murphyd P. Role of environmental cleaning in controlling an outbreak of *Acinetobacter baumannii* on a neurosurgical intensive care unit. *J Hosp Infect* 56:106–110, 2004.

Deschamps C, Clermont O, Hipeaux MC, Arlet G, Denamur E, Branger C Multiple acquisitions of CTX-M plasmids inthe rare D2 genotype of *Escherichia coli* provide evidence forconvergent evolution. *Microbiology* 155: 1656–1668, 2009.

Dexter C, Murray GL, Paulsen IT, Peleg AY. Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 13(5):567–573, 2015.

Dice LR. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26(3):297-203, 1945.

Dickgiesser N. Untersuchungen über das Verhalten grampositiver und gramnegativer Bakterien in trockenem und feuchtem Milieu. Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene, *I Abt Orig B* 167:48-62, 1978.

Djahmi N, Dunyach-remy C, Pantel A, Dekhil M, Sotto A, Lavigne J. P. Epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. *Biomed Res Int* 24: 1-11 2014.

Doyle MP. Antimicrobial resistance: implications for the food system. Compr.*Rev Food Sci Food Saf* 5: 71–137, 2006.

Eibitch SJ, Vogel U. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (*MRSA*) contamination of ambulance cars after short term transport of *MRSA*-colonised patients is restricted to the stretcher. *J Hosp infec 78*: 221-225, 2011.

Elumalai EK, David E, Hemachandran J. Bacterial contamination of Indian currency notes (Rupee). *Int J Occup Environ Med* 3:(4):204–205, 2012.

Endiamiani A, DePasquale JM, Forero S, Perez F, Hujer AM, Roberts-Pollack D, Fiorella PD, Pickens N, Kitchel B, Casiano-Colón AE, Tenover FC, Bonomo RA Emergence of blaKPC-containing Klebsiella pneumoniae in a long-term acute care hospital: a new challenge to our heathcare system. J Antimicrob Chemoth 64:1102-1110, 2009.

Enoch DA, Birkeet CI, Ludlam HA. Non-fermentative Gram-negative bacteria.*Int J Antimicrob Ag* 29: S33-S41, 2007.

Esteves DC, Pereira VC, Souza JM, Keller R, Simões RD, Eller LKW, Rodrigues MVP. Influence of biological fluids in bacterial viability on diferente hospital surfaces and fômites. *Am J Infect Control* 1-4, 2015.

Evans BA, Amyes SGB. Oxa-betalactamases. *Clin Microbiol Rev* 27:241-263, 2014.

Falagas ME, Kopterides P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. *J Hosp Infect* 64: 7-15, 2007.

Fariñas MC, Martínez–Martínez L. Infecciones causadas por bactérias gramnegativas multirresistentes: enterobactérias, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii y otros bacilos gram-negativos no fermentadores. Enferm Infecc Microbiol Clin 31:402-409, 2013.

Fazzeli H, Sadighian H, Esfahani BN, Pourmand MR. Genetic characterization of *Pseudomonas aeruginosa*-resistant isolates at the university teaching hospital in Iran. *Adv Biomed Res* 4: 156, 2015.

Fournie PE, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis* 42:692–699, 2006.

Fujitani S, Sun HY, Yu VL, Weingarten JA. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 139: 909-919, 2011.

Galvin S, Dolan A, Cahill O, Daniels S, Humphreys H. Microbial monitoring ofthe hospital environment: why and how? J Hosp Infect 83: 143-151, 2012.

García CS, Gándara MP, García FJC. Betalactamasas de espectro extendido em enterobactérias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28: 12-18, 2010.

Gayoso CM, Mateos J, Mendez JA, Fernandez-Puente P, Rumbo C, Tomas M. Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in Acinetobacter baumannii. *J Proteome Res* 13:460-476, 2014.

Gerba CP, Pepper IL. Domestic and Indoor Microbiology.*In*: Maier R, Pepper I, Gerba C. Environmental Microbiology. Academic Press. San Diego. 2009.

Gerhardts A, Hammer TR, Balluff C, Mucha H, Hoefer D. A model of the transmission of microrganism in a public setting and its correlation to pathogen infection risk. *J Appl Microbiol* 112:614-621, 2012.

Giske CG, Monnet DL, Cars O, Carmeli Y. ReAct–Action on Antibiotic Resistance. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Ch* 52:813–821, 2008.

Gniadkowski M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum b-lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect* 7:597–608, 2001.

Goldmann DA. Transmission of viral respiratory infections in the home. Pediatr. *Infect. Dis. J* 19:S97-102, 2000.

Greene C, Vadlamudi G, Newton D, Foxman B, Xi C. The influence of biofilm formation and multidrog resistance on environment survival of clinical and environment isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Am J infect Control,* 2015.

Guerrero PP, Sánchezb FG, Saboridoa DG, Lozanob IG. Infecciones por enterobacterias. *Medicine* 11:3276-3282, 2014.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2: 95–108, 2004. http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro821.

Hirai Y: Survival of bacteria under dry conditions from a viewpoint of nosocomial infection. *J Hosp Infect* 19:191-200, 1991.

Ho J, Tambyah PA, Paterson DL Multiresistant Gram-negative infections: a global perspective. *Curr Opin Infect Dis* 23:546-553, 2010.

Hota B. Contamination, disinfection and cross-colonization: are hospital surface reservoirs for nosocomial infection? Clin. Infect. Dis. 39:1182–1189, 2004.

Huang SS, Datta R, Platt R. Risk of acquiring antibiotic-resistant bacteria from prior room occupants. *Arch Intern Med* 166:1945–1951, 2006.

Hubner NO, Hubner C, Kramer A, Assadian O. Survival of bacterial pathogens on paper and bacterial retrieval from paper to hands: preliminary results. *Am. J. Nurs* 111:30–34, 2011. http://dx.doi.org/10.1097/01

Huijbers P, Blaak H, Mart CMJ, Graat EAM, Vanderbroucke-Grauls CMJE, Husman AMR. Role of the environment in the transmission of antimicrobial resistance to humans: a review. *Environ Sci Technol* 1-44, 2015.

Huslage K, Rutala WA, Sickbert-Bennett E. A quantitative approach to defining “high-touch” surfaces in hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* 31:850–853, 2010.

Ibfelt T, Hoy EE, Permin A, Madsen JS, Schultz AC, Andersen LP. Presence of pathogenic bacteria and viruses in the daycare environment. *J Environ Health* 78: 24-29, 2015.

Iwao Y, Yabe S, Takano T, Higuchi W, Nishiyama A, Yamamoto T. Isolation and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from public transport. *Med Microbiol Immun* 56:76-82, 2012.

Jacoby GA. AmpC betalactamases. *Clin Microbiol Rev* 22:161-182, 2009.

Jean SS, Lee WS, Lam C, Hu CW, Chen RJ, Hsueh PR. Carbapenemases-producing Gram-negative bacteria: current Epidemics, antimicrobial susceptibility and treatment options. *Future Microbiol* 10:407-425, 2015.

Jeong EU, Lee KS, Heo SH, Seo JH, Choi YK. Rapid Identification of *Klebsiella pneumoniae, Corynebacterium kutscheri*, and *Streptococcus pneumoniae* Using Triplex Polymerase Chain Reaction in Rodents. *Exp Anim Tokyo* 62:35-40, 2013.

Jones RN. Important and emerging β-lactamase-mediated resistances in hospitalbased pathogens: the AmpC enzymes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 31:461-466, 1998.

Joyner J, Wanless D, Sinigalliano CD, Lipp EK. Use of quantitative real-time PCR for direct detection of Serratia marcescens in marine and other aquatic environments. *Appl Environ Microbiol* 80:1679–1683, 2014.

Judah G, Donachie P, Cobb E, Schmidt W, Holland M. Dirty hands: bacterial of faecal origin on commuter's hands. *Epidemiol Infect* 138:409-414, 2010.

Julian TR, MacDonald LH, Guo Y, Marks SJ, Kosek M, Yori PP, Pinedo SR, Schwab KJ Short report: fecal indicator bacteria contamination of fomites and household demand for surface disinfection products: a case study from Peru. *Am J Trop Med Hyg* 89:869-672, 2013.

Kazmierczak KM, Lob SH, Hoban DJ, Hackel MA, Badal RE, Bouchillon SK. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases andantimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* in intra-abdominalinfection isolates in Latin America, 2008–2012. Results of the Study forMonitoring Antimicrobial Resistance Trends.*Diagn Microbiol Infect Dis,* 2015.

Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 6:130, 2006.

Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57:1486– 1513, 2005.

Kumar BV, Hobani YH, Abdulhaq A, Jerah AA, Hakami OM, Eltigani M, Bidwai AK. Prevalence of antibacterial resistant bacterial contaminants from mobile phones of hospital inpatients. *Libyan J Med* 9, 2014.

Kumarasamy, KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishman R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnam P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 10:597–602, 2010.

Kuria JK, Wahome RG, Jobalamn M, Kariuki SM. Profile of bacteria and fungi on money coins. *East Afr Med J* 86(4):151–155, 2009.

Laupand KB, Church DL, Ross T, Pitout JDD. Population-based laboratory surveillance of Hafnia alvei isolates in a large Canadian health region. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 5, 2006. doi:10.1186/1476-0711-5-12

Lautenbach E, Perencevich EN. Addressing the emergence andimpact of multidrug-resistant Gram-negative organisms: a criticalfocus for the next decade. *Infect Control Hosp Epidemiol* 35:333–335, 2014.

Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, et al. Capacity of multidrugresistant clinical isolates of Acinetobacter baumannii to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect* 14:49-54, 2008.

Lestari T, Ryll S, Kramer A. Microbial contamination of manually reprocessed, ready to use ECG lead wire in intensive care units. *GMS Hyg Infect Control* 8: 07, 2013.

Leung WS, Chu CM, Tsang KY, Lo FH. Ho PL. Fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia as a distinct clinical syndrome. *Chest* 129:102-109, 2006.

Leverstein-Van Hall MA, Stuart JC, Voets GM, Versteeg D, Tersmette T, Fluit AC. Global spread of NDM-1. *Lancet Infect. Dis*. 10, 830–831, 2010.

Levin PD, Shatz O, Sviri S, Moriah D, Or-Barbash A, Sprung CL, Moses AE, Block C.Contamination of portable radiograph equipment with resistant bacteria inthe ICU. *Chest J*.136:426–432, 2009.

Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol* 64:357-72, 2010.

Lin CL, Chiu C, Chu YC, Huang TY, Lin JT. A 36 multiplex polymerase chain reaction method for rapid identification of 37 Citrobacter freundii and Salmonella species, including Salmonella Typhi. J. 38 *Microbiol Immunol Infect* 40:222-226, 2007.

Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N.What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation ofchloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillinand tigecycline. *Int J Antimicrob Ag* 37:415-419, 2011.

Lopez GU, Gerba CP, Tamimi AH, Kitajima M, Maxwell SL, Rose JB. Transfer efficiency of bacteria and viruses from porous and nonporous fomites to fingers under different relative humidity conditions. *Appl Environ Microbiol* 79:5728-5734, 2013.

Longtin Y, Sax H, Allegranzi B, Schneider F, Pittet D. Hand hygiene. *N Engl J Med* 364(13), 2011.

Lutz JK, Balen JV, Crawford JM, Wilkins JR, Lee J, Nava-Hoet RC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in public transportation vehicles (buses): Another piece to the epidemiologic puzzle. *Am J Infect Control* 42:1285-1290, 2014.

Luzzaro F, Brigantea G, D'Andreab MM, Pini B, Gianib T, Mantengoli E, Rossolini GM, Tonioloa A. Spread of multidrug-resistant Proteus mirabilis isolates producing an AmpC-type beta-lactamase: epidemiology and clinical management. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33: 328–333, 2009.

Maravic A, Skocibusic M, Cvjetan S, Samanic I, Fredotovic Z, Puizina J. Prevalence and diversity of extended spectrum B lactamase producing Enterobacteriaceae from marine beach waters. *Mar Pollut Bull* 90:60–67, 2015.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmet G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria:an international expert proposal for interim standard definitions foracquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18: 268-281, 2012.

Marks LR, Reddinger RM, Hakansson AP. Biofilm formation enhances fomites survival os *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* 82(3): 1141-1146, 2014.

Martínez-Bastidas T, Castro-del CN, Mena KD, Castro-del Campo N, Lenón-Félix J, Gerba CP, Chaidez C. Detection of pathogenic micro-organisms on children's hands and toys during play. *J App Microbiol* 116:1668-1675, 2014.

Martins WT. Índice de avaliação da qualidade do transporte público por ônibus a partir da definição de serviço adequado. [Dissertação]. UnB, Brasília, 2015.

Matsuo M, Oie S, Furukawa H. Contamination of blood pressure cuffs by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and preventive measures. *Ir J Med Sci* 182(4):707–709, 2013.

McQueary CN, Actis LA. *Acinetobacter baumannii* biofilms: variations among strains and correlations with other cell properties. *J Microbiol* 49: 243-250, 2011.

Medrano-Félix A, Martínez C, Castro-del Campo N, León-Félix J, Peraza-Garay F, Gerba CP., Chaidez C. Impact of prescribed cleaning and disinfectant use on microbial contamination in the home. *J Appl Microbiol* 110:463–471, 2011.

METROBUS, 2013. [acesso 10 janeiro 2016] <http://www.metrobus.go.gov.br/post/ver/167188/nossa-historia>.

Meyer G, Picoli SD. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. *J Bras Patol Med Lab* 47:666-671, 2009.

Miller LG, Diep BA Colonization, Fomites, and Virulence: Rethinking the Pathogenesis of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus. Clin Infect Dis* 46:752-760, 2008.

Miranda CC, Filipis I, Coelho-Souza T, Bianco K, Cacci LC, Picão RC, Clementino MM. Genotypic Characteristics of multidrug-resistant *Pseudomonasaeruginosa* from Hospital Wasterwater Treatment Plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J App Microbiol* 118: 1276-1286, 2015.

Mitscherlich E, Marth EH. Microbial survival in the environment. *Berlin, Springer*, 1984.

Molina J, Cisneros JM, Ferna´ndez-Cuenca F. Clinical features of infections and colonization by Acinetobacter Genospecies. *J Clin Microbiol* 48(12):4623-4626, 2010.

Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Ch* 53:333-334, 2009.

Montezzi LF, Campana EH, Correa LL, Justo LH, Paschoal RP, Silva ILVD: Souza MDCM, Drolshagen M, Picao RC. Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. *Int J Antimicrob Agents* 45, 174–177, 2015.

Morgan DJ, Liang SY, Smith CL, Johnson JK, Harris AD, Furuno JP, Thom KA, Snyder GM, Day HR, Perencevich EN. Frequent Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Contamination of Gloves, Gowns, and Hands of Healthcare. *Infect Control Hosp Epidemiol* 31(7):716–721, 2012. doi:10.1086/653201

Morrill H, Pogue J, Kaye K, LaPlante K. Treatment options for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Open Forum Infect Dis* 2:2015.

Munoz-Price LS, Arheart KL, Mills JP, Cleary T, DePascale D, Jimenez A. Associations between bacterial contamination of health care workers' hands and contamination of white coats and scrubs. *Am J Infect Control* 40(9):245–248, 2012.

Murta FL, Massara CL. Presença de ovos de helmintos intestinais em ônibus de transporte público em Belo Horizonte – Minas Gerais, Brasil. *Rev Patol Trop* 38(3): 207 – 212, 2009

Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P, Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase blaKPC gene. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1257–1263, 2008.

Nadjar D, Rouveau M, Verdet C, Donay L, Herrmann J, Lagrange PH, Philippon A, Arlet G: Outbreak of Klebsiella pneumoniae producing transferable AmpC-type beta-lactamase (ACC-1) originating from Hafnia alvei. *FEMS Microbiol Lett* 187:35-40, 2000.

Neely NA, Maley MP. Survival of *enterococci* and *staphylococci* on hospital fabrics and plastic. *J Clin Microbiol 38*:724–726, 2000.

Ni M, Zhang D, Qi J. Analysis of AmpC β-lactamase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 25:17-23, 2005.

Nicas M, Sun G. A integrated model of infection risk in a healthcare environment. *Risk Anal* 26:1085-1096, 2006.

Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 17:1791–1798, 2011.

Noskin GA, Stosor V, Cooper I, Peterson LR: Recovery of vancomycin-resistant enterococci on fingertips and environmental surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol* 16:577-581, 1995.

Nwankwo E. Isolation of pathogenic bacteria from fomites in the operating rooms of a specialist hospital in Kano, North-western Nigeria. *Pan Afri Med J* 12:1-10: 2012.

Nwugo CC, Arivett BA, Zimbler DL. Effect of ethanol on differential protein production and expression of potential virulence functions in the opportunistic pathogen Acinetobacter baumannii. *PLoS One* 7(12) 2012.

Oh YJ, Song SH, Baik SH. A case of fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia in Korea. *Korean J Intern Med* 28(4): 486-90, 2013.

Oliveira A, Capalonga R, Silveira JT, Tondo EC., Cardoso MRI. Avaliação da presença de microrganismos indicadores higiênico-sanitários em alimentos servidos em escolas públicas de Porto Alegre, Brasil. Cien Saude Colet 18:955-962, 2013.

Oliveira CF, Forno NLF, Alves IA, Horta JA, Rieger A, Alves SH. Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de β-lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella spp*. no Hospital Universitário de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop 42: 556-560, 2009.

Otter JA, French GL. Community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as a cause of healthcare-associated infection. *J Hosp Infect* 79:189-193, 2011.

Panagea S, Winstanley C, Walshaw MJ, Ledson MJ, Hart CA. Environmental contamination with an epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* in a LiverPool cystic fibrosis centre, and study of its survival on dry surfaces. *J Hosp Infect* 59:102-107, 2005.

Pantel A, Richaud-Morel B, Cazaban M, Bouziges N, Sotto A, Lavigne J. Environmental persistence of OXA-48eproducing *Klebsiella pneumoniae* in a French intensive care unit. *Am J Infect Control* 1-3, 2015.

Papp-Wallace KM, Bethel CR, Distler AM, Kasuboski C, Taracila M, Bonomo RA. Inhibitor resistance in the KPC-2 beta-lactamase, a preeminent property of this class A beta-lactamase. *Antimicrob Agents Ch* 54: 890–897, 2010.

Paterson DL. Resistance in Gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Infect Control*34:S20–S28:S64–S73, 2006.

Pavlovic M, Luze A, Konrad R, Berger A, Sing A, Bush U, Huber I. Development of a duplex real-time PCR for differentiation between *E. coli* and *Shigella spp*. *J Appl Microbiol*110:1245-1251, 2011.

Pavlovic M, Konrad R, Iwobi AN, Sing A, Bush U, Huber I.A dual approach employing *MALDI-TOF* MS and real-time PCR for fast species identification within the *Enterobacter cloacae* complex.*Fems Microbiol Lett* 328:46-53, 2012.

Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Fems Microbiol Lett* 21:538-582, 2008.

Penna VTC, Martins SAM, Mazola PG. Identificationof bacteria in drinking and purified water during the monitoring of atypical water purification system. *BMC Public Health* 2: 13-23, 2002.

Pina ECS. Estudo da suscetibilidade a antibióticos de enterobactérias isoladas nos Hospitais da Universidade de Coimbra: detecção laboratorial de betalactamases. Coimbra: [Dissertação de mestrado Faculdade de Farmácia de Coimbra], 2012.

Pitout JDD, Laupand KB. Extended-spectrum [beta]-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 8:159–166, 2008.

Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 44:891–897, 2000a.

Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:622–632, 2000b.

Poirel L, Maskari AL, Rashdi FA, Bernabeu S, Nordmann P. NDM-1-producing Klebsiella pneumonia isolated in the Sultanate of Oman. *J. Antimicrob. Chemother* 66, 304–306, 2011.

Prado MA, Pimenta FC, Hayashid M, Souza PR, Pereira MS, Gir E. Enterobactérias isoladas de baratas (*Periplaneta americana*) capturadas em um hospital brasileiro. *Pan Am J Public Health* 11:(2), 2002.

Queenan AM, Shang W, Schreckenberger P, Lolans K, Bush K, Quinn J, SME-3, a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenemhydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 3485–3487, 2006.

Rao DA, Aman A, Mubeen SM, Shah, A. Bacterial contamination and stethoscope disinfection practices: a cross-sectional survey of healthcare workers in Karachi, Pakistan. *Tropical Doctor* 1-5, 2017.

Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O'Gara C, Medeiros AA. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenemhydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Ch* 40:2080–2086: 1996.

Reynolds KA, Watt PM, Boone SA, Gerba CP. Occurrence of bacteria and biochemical markers on public surfaces. *Int J Environ Health Res*15:225–234, 2005.

Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. Standardization of Pulsed Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O:157 H:7, *Salmonella*, and *Shigella* for Pulsenet. *Foodborne Pathog Dis*3:59-67, 2006.

RMTC, Rede Metropolitana de Transporte Coletivo. [Acesso 10 janeiro 2016] <http://www.rmtcgoiania.com.br/sobrea-a-rmtc/informacoes-institucionais>.

Roberts ME, Stewart PS. Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. Microbiology 151: 75-80, 2005.

Rocha DAC, Campos JC, Passadore LF, Sampaio SCF, Nicodemo AC, Sampaio JLM. Frequency of plasmid-mediated AmpC betalactamases in *Escherichia coli* isolates from urine samples in São Paulo, Brazil. *Microb Drug Resist* 1-7, 2015.

Rodrigues APD, Nishi CUM, Guimarães ATB. Levantamento de bactérias, fungos e formas de resistência de parasitos em duas rotas de ônibus do transporte coletivo de Curitiba, Paraná. RUBS, Curitiba 2:24-31, 2006.

Roux D, Aubier B, Cochard H, Quentin R, van der Mee-Marquet N. Contaminated sinks in intensive care units: an underestimated source ofextended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in thepatient environment. *J Hosp Infect* 85: 106-111, 2013.

Rusin P, Maxwell S, Gerba C. Comparative surface-to-hand and fingertip-to-mouth transfer efficiency of gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, and phage. *J App Microbiol* 93:585–592, 2002.

Russotto V, Cortegiani A, Raineri SM, Giarratano A. Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipament in the intensive care unit. *J Intensive Med Care*. 3:2-8, 2015.

Ryan MO, Haas CN, Gurian PL, Gerba CP, Panzl BM, Rose JB. Application of quantitative microbial risk assessment for selection of microbial reduction targets for hard surface disinfectants. *Am J Infect Control* 42: 1165-72, 2014.

Savini V, Di Bartolomeo E, Catavitello C. Graft versus host disease-related *Hafnia alvei* colonization and probable infection. *J Med Microbiol* 57(9):1167–1169, 2008.

Schuchat A, Hilger T, Zell E, Farley MM, Reingold A, Harrison L, Lefkowitz L, Danila R, Stefonek K, Barrett N, Morse D, Pinner R: Active bacterial core surveillance of the emerging infections program network. *Emerg Infect Dis*, 7:92-99, 2001.

Scott E. Community-based infections and the potential role of common touch surfaces as vectors for the transmission of infectious agents in home and community settings. *Am J Infect Control* 41:1087-1092, 2013.

Shokoohi HA, Armstrong P, Tansek R. Emergency department ultrasound probe infection control: Challenges and solutions. *Open Access Emerg Med* 7:1–9, 2015.

Sinclair RG, Gerba CP. Microbial contamination in kitchens and bathrooms of rural Cambodian village households. *Lett Appl Microbiol* 52:144–149, 2011.

Siroy A, Cosette P, Seyer D, Lemaitre-Guillier C, Vallenet D, Van Dorsselaer A, Boyer-Mariotte S, Jouenne T. Global comparison of the membrane subproteomes between a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain and a reference strain. *J Proteome Res* 5:3385–3398, 2006.

Sneath PHA, Sokal RR. Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification, W. H. Freeman, San Francisco, CA, 1973.

Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill* 13, 2008.

Springthorpe V S, Sattar SA. Chemical disinfection of virus contaminated surfaces. *Crit Rev Environ Control* 20:169–229, 1990.

Stanic M, Hartmann G, Lhotta K. Case Report: Hafnia alvei Urosepsis in a Kidney Transplant Patient. *Case Reports in Transplantation*, 2015.

Stojek NM, Szymanska J, Dutkiewicz, J. Gram-negative bacteria inwater distribution systems of hospitals. *Ann Agr Environ Med* 15: 135–1422008.

Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56:187–209.

Sui Y-S, Wan G-H, Chen Y-W, Ku H-L, Li L-P, Liu C-H, et al. Effectiveness ofbacterial disinfectants on surfaces of mechanical ventilator systems. *Respir Care* 57(2):250–256, 2012.

Tang CY, Yiu SM, Kuo HY, Tan TS, Liao KH, Liu CC, Hon WK, Liou ML. Application of 16S rRNA metagenomics to analyze bacterial communities at a respiratory care centre in Taiwan. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 2871-2881, 2015.

Thomson KS. Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *J Clin Microbiol* 48:1019–1025, 2010.

Todd ECD, Greig JD, Bartleson CA, Michaels BS. Outbreaks Where Food Workers Have Been Implicated in theSpread of Foodborne Disease.Part Transmission and Survival of Pathogens in the Food Processing andPreparation Environment.*Journal of Food Protection*72: 202-219, 2009.

Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* 149:3473-3484, 2003.

Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psichogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisisof global dimensions. *Clin Microbiol Rev*25:682-707, 2012.

Ulger F, Dilek A, Esen S, Sunbul M, Leblebicioglu H. Are healthcare worker's mobile phones a potential source of nosocomial infections? Review of the literature. *J Infect Dev Ctries* 9:1046-1053, 2015.

Ulger F, Esen S, Dilek A, Yanik K, Gunaydin M, Leblebicioglu H. Are we aware how contaminated our mobile phones with nosocomial pathogens? *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 8:1-4, 2009.

Ustun C, Cihangiroglu M. Health care workers' mobile phones: a potential cause of microbial cross-contamination between hospitals and community. *J Occup Environ Hyg* 9:538-542, 2012.

Vasques MR, Bello AR, Lamas CC, Correa J, Pereira JAA. Betalactamase producing enterobacteria isolated from surveillance swabs of patients in a Cardiac Intesive Care Unit in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis* 15: 28-33, 2011.

Vila J, Marco F. Interpretive reading of the non-fermenting Gram-negative bacilli antibiogram. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28:726–736, 2010.

Vivas J, Padilla D, Real F, Bravo J, Grasso V, Acosta F. Influence of environmental conditions on biofilm formation by *Hafnia alvei* strains. *Vet Microbiol* 129:150–155, 2008.

Volker S, Schreiber C, Kistemann T. Drinking water quality inhousehold supply infrastructure. A survey of the current situation inGermany.*Int J Hyg Environ Health*213: 204–209, 2010.

Walter-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 57:373–383, 2006.

Weber DJ, Rutala W A, Miller M B, Huslage K, Sickbert-Bennett E. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: *norovirus, Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *American Journal of Infection Control*. 38:S25–33: 2010.

Webster C, Towner KJ, Humphreys H: Survival of *Acinetobacter* on three clinically related inanimate surfaces. *Infect Control Hospital Epidemiol* 21:246, 2000.

Wendt C, Wiesenthal B, Dietz E, Rüden H: Survival of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococci on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 36:3734-3736, 1998.

Whittington A, Whitlow G, Hewson D, Thomas C, Brett S. Bacterialcontamination of stethoscopes on the intensive care unit. *Anaesthesia*64: 620-624, 2009.

Williams MR, Stedtfeld RD, Guo X, Hashsham SA. Antimicrobial Resistance in the Environment. *Water Environ Res* 88(10):1951 – 1967, 2016.

Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *Fems Microbiol Rev* 35:736-755, 2010.

World Health Organization.World Health Statistics 2014. [Acesso 6 maio 2016] <http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index>

Ye D, Shan J, Huang Y, Li J, Li C, Liu X. A gloves-associated outbreak of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii in an intensive care unit in Guangdong, China. *BMC Infect Dis* 15:179, 2015.

Yeh PJ, Simon DM, Millar JA, Alexander HF, Franklin D. A diversity of antibiotic resistant Staphylococcus spp. in a public transportation system. *Osong Public Health Res Perspect* 2:202-209, 2011.

Yezli S, Shibl AM, Memish ZA. The molecular basis of betalactamase production in Gram negative bacteria from Saudi Arabia.*J Med Microbiol* 64:127-136, 2015.

Zanetti F, Luca G, Leoni E. Sacchetti R. Occurrence of non-fermenting Gram negative bactéria in drinking water dispensed from point-of-use microfiltration devices. *Ann Agric Environ Med* 21: 29-34, 2014.

Zeana C, Larson E, Sahni J, Bayuga SJ, Wu F, Della-Latta P. The epidemiology of multidrug-resistant *acinetobacter baumannii*: does the community represent a reservoir? *Infect Control Hosp Epidemiol* 24(4):275-279, 2003.

Zhang T, Yang Y, Pruden A.Effect of temperature on removal of antibiotic resistance genes by anaerobic digestion of activated sludge revealed by metagenomic approach. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:7771–7779, 2015.

Anexo 1

Autorização emitida pelas empresas RMTC e Metrobus, permitindo que as coletas fossem realizadas em todos os ônibus, terminais e plataformas da linha Leste-Oeste do município de Goiânia – GO.

Associação de Educação e Cultura de Goiás - AECG

FACULDADE PADRÃO III

Departamento de Biomedicina

Ao Senhor Presidente da Metrobus Transporte Coletivo S/A,

Carlos Maranhão

Os acadêmicos do curso de biomedicina da Faculdade Padrão de Goiânia, orientados pela professora Dra. Janine de Aquino Lemos Mundim vêm por meio dessa, solicitar da Metrobus a autorização para coletar material dentro dos ônibus que circulam no sentido leste-oeste da capital, bem como, de materiais dos terminais de ônibus e também dos passageiros que fazem uso do transporte coletivo no município de Goiânia. Esse material será coletado nas barras fixas de metais existentes dentro dos ônibus, nos telefones públicos de dentro dos terminais, nas maçanetas das portas que dão acesso aos sanitários públicos e nas roletas por onde entram os passageiros. Mediante um termo de consentimento livre esclarecido da pesquisa e com a aquiescência dos usuários, material das mãos dos passageiros também poderá ser coletado. Todo esse material será analisado quanto à existência e quantificação de microrganismos como fungos e bactérias. A finalidade desse estudo se dá para a realização do trabalho de conclusão de curso dos estudantes de biomedicina da Faculdade Padrão de Goiânia. Asseguramos que o trabalho não trará nenhum risco aos usuários do transporte coletivo bem como aos veículos e terminais, pois os mesmos não serão identificados. Além disso, de posse dos resultados poderá se propor ações de educação sanitária/higiência como contribuição para a melhoria do serviço prestado pela Metrobus. A faculdade Padrão, através da professora Dra. Janine de Aquino Lemos Mundim e dos acadêmicos do curso de biomedicina se responsabilizam totalmente pelos custos e realização da pesquisa. Os pesquisadores se comprometem a entregar uma cópia dos resultados da pesquisa à Metrobus fornecedora dos dados, sem onerar nenhum custo. Para maiores esclarecimentos a respeito da pesquisa os alunos encaminharão posteriormente uma cópia do projeto, afim de que se possa conhecer todos os detalhes do estudo.

Sem mais para o momento, agradecemos antecipadamente a atenção e colaboração com a pesquisa científica

Profa. Dra. Janine de Aquino Lemos Mundim
Faculdade Padrão de Goiânia

AUTORIZO NA FORMA DA LEI
Goiânia: 02/08/2011

Hugo Dourado de Campos
Diretor Administrativo
METROBUS

Anexo 02

Quadro: Datas das coletas realizadas nos ônibus, plataformas e terminais da linha Leste-Oeste, Goiânia – GO.

Dia	Ônibus	Plataforma/Terminal
20/08/2012	1066	PB
28/09/2012	1072	PR 7, PR 20
02/10/2012	1058	PBO, PJ
09/10/2012	1010, 1024, 1027	
11/10/2012	1008, 1054, 1059	
17/10/2012	1065, 1071	
22/10/2012	1020, 1055	
13/11/2012	1074, 1075	
16/11/2012	1023, 1029	
10/11/2012	1006, 1028	
27/11/2012	1002, 1014	
31/11/2012	1040,1077	
04/12/2012	1035, 1046	
07/01/2013	1013, 1061, 1069	
10/01/2013	1017, 1034, 1036, 1049	
21/01/2013	1009, 1056, 1067, 1070	
23/01/2013	1015, 1042, 1060, 1085	
04/02/2013	1022, 1043, 1050, 1083	
18/02/2013	1007, 1044, 1047	
25/02/2013	1021, 1084, 1086	
05/03/2013	1031, 1052, 1088, 1089	
11/03/2013	1011, 1019, 1045, 1079	
12/03/2013	1018, 1062, 1078, 1082	
18/03/2013	1004, 1025, 1033, 1048	
23/03/2013	1001, 1012, 1039, 1081	
25/03/2013	1030, 1047, 1068, 1087	
09/04/2013	1080, 1090	
12/04/2013	1037, 1041, 1051, 1064	
16/04/2013	1003, 1016, 1073, 1076	
23/04/2013	1005, 1063	
30/04/2013	1026	PA
07/05/2013	1038	PM, PVM
08/05/2013		PU, TPB, PVB
14/05/2013		TNM, PHGG
22/05/2013		PLR, P24O, TPA
04/06/2013		PC, PJH, PCAS
05/06/2013		PA, PCAP, PIQ
11/06/2013		TD, TPP
12/07/2013	1032, 1053	

Legenda: **P** – plataforma de embarque/ desembarque; **T** – terminal de integração

Anexo 3

Artigo científico realizado sob as normas da revista "*Applied and Environmental Microbiology"*

Molecular Epidemiology of Gram-negative rods from Collective Public Transport System in the central region of Brazil

Luana Lamaro[a], Maria Cláudia D.P.B. André[a], Christian Chagas[b], Lorrane Sousa Neves[a]; Juliana Lamaro Cardoso[a],

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil[a], Metrobus Transporte Coletivo S/A[b]

ABSTRACT

Objects contaminated with microorganisms are denominated fomites. Several studies have reported fomites as possible sources of dissemination of microorganisms. However, few studies have shown presence of Gram-negative rods contaminating the surfaces of the collective public transport system. This study aimed to isolate and identify Gram negative rods from a collective public transport line in the Goiânia city, to characterize by phenotypic and genotypic methods the antimicrobial susceptible profile and analyze the macrorestriction profile of the isolates. The samples of handrails surfaces of the buses and ratchets of the platforms and terminals of the "Leste-Oeste" line were collected with swab, introduced into a tube containing BHI broth and sent to the Laboratory of Applied Bacteriology of the IPTSP-UFG. After the growth of Gram negative rods, species were identified through multiplex PCR and submitted to the Antimicrobial Susceptibility Test. The plasmid DNA of strains considered resistant to beta-lactams was extracted for the search of the beta-lactamases genes by PCR. Finally, the macrorestriction profile of *P. mirabilis* strains was determined by PFGE, using the enzyme *XbaI*. Our results showed

prevalence of 46.0 % of Gram negative rods on the evaluated surfaces. The species identified were: *A. baumannii* (40.8 %), *H. alvei* (30.9 %), *P. mirabilis* (26.1 %) and *E. coli* (2.2 %). The antimicrobial susceptibility test revealed 31 (7.9 %) isolates characterized as multidrug resistant. The bla_{TEM} genes were detected in two *H. alvei*, the bla_{CTX} gene in three *H. alvei* and one in *P. mirabilis*. We observed a presence of eight clusters and three clones among species of *P. mirabilis*. This study proves that the surfaces of the collective public transport system may be sources of multidrugs resistant Gram negative rods and these bacteria have dispersal potential in different community environments.

INTRODUCTION

Surfaces of environments and objects when contaminated by microorganisms, are called fomites (1). The recognition of the fomites promoted changes in the perspective of microorganism transmission, considering it more complex and multifactorial (2).

The transmission mechanisms of microorganisms are well defined and can be classified as direct or indirect transmission. Direct transmission of microorganisms involves contact with contaminated body secretions from other individuals, eg, blood, urine, feces, nasal secretion or contamination with the endogenous microbiota. Transmission of microorganisms through air, wind, dust and transmission by vector animals, especially insects, is also included. Indirect transmission, in turn, involves contact with contaminated objects, mainly through the hands (2).

It has been reported that Gram-negative bacilli (GNB) have the capacity to persist for longs periods in fomites present in people's daily lives (3). The viability of these microorganisms, even under adverse environmental conditions, favors outbreaks originating in the community, resulting from cross contamination due to poor hand

hygiene (4). These events increase hospital admissions, increase antimicrobial use, promote bacterial resistance, and generate public health costs (5). In addition, GNB may have high rates of antimicrobial resistance and are associated with high mortality and morbidity rates (6).

Places with high concentrations of people and frequently touched surfaces are more conducive to the spread of bacteria. Some studies are conducted in public areas or with everyday objects. Among them, there have been demonstrations of attendance at day care centers (7), offices (8), schools (9), micro-organisms retained in cash (10), emergency medical vehicles (11) buses, subways (12-15) and trains (16).

The collective public transport system deserves to be highlighted as a source of bacterial spread due to the great circulation of people daily. The users of these services are in constant contact with surfaces such as ratchets, handrails, seats, doors and windows, and they do not have a structure for hand hygiene. Consequently, an environment conducive to the contamination and dissemination of microorganisms is created (15). In addition, buses travel connecting neighborhoods, schools, health institutions, restaurants and other urban community environments, help to spread pathogens in differents parts of the city.

In Brazil, there is little data about fomites presents in collective public transport systems, mainly studies that show the presence of GNB in these transports (12). This information could help reduce the spread of pathogens, as well as provide epidemiological bases for monitoring and controlling them (1). In this context, this study aimed to estimate the prevalence of microbial contamination by Gram negative bacilli in bars of buses and turnstiles of the platforms and terminals of the “Leste-Oeste” line of the public public transport system in central Brazil.

MATERIALS AND METHODS

The samples were collected on the “Leste-Oeste” line of the Metropolitan Transit Transport Network of the municipality of Goiânia, state of Goiás, from August 2012 to July 2013. The collections were carried out daily, with the vehicle in traffic, after the peak hours, between 9 and 11 o'clock in the morning and 2 o'clock and 5 o'clock pm.

With the aid of sterile swabs, the samples of the vertical and horizontal fixed bars of the four entrance / exit ports of all 90 buses circulating in the line were collected, as well as the incoming and outgoing turns of the five terminals and the 19 platforms that are arranged along the line. The swabs moistened in BHI broth (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) were firmly rubbed at the site to be collected in rotary motions, packed in refrigerated sterile tubes containing 2 mL of the same broth and immediately sended to the Laboratory of Applied Bacteriology of the Federal University of Goiás for the microbiological procedures. The samples were plated on MacConkey agar (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England) and Cetrimide agar plus 1% glycerol and incubated at 35 ° C for 24 hours.

Colonies suspected of GNB were identified by multiplex PCR. For the molecular identification, the isolates were submitted to extraction of the genomic DNA, following the boiling extraction methodology (17), with modifications. Boiled DNA was used as a template for the molecular identification of Gram negative rod species. The primers used in the reactions amplification for the identification of the species of interest are listed in Table 1.

Table 1: List of primers used in reactions mPCR for the identification of species of interest isolated from public transport system of Goiania-GO.

Species	Sequence (5'→3')		*Amplicon* size (pb)	Reference
Hafnia alvei	*Forward*	CTAACTCCGTGCCAGCAGCCG	393	Unplublished data
	Reverse	GCGGCCGTACTCCCCAGG		
Enterobacter aerogenes	*Forward*	GGATCATGCCGTTAAAATGGACC	100	Unplublished data
	Reverse	CGGTGAACGGCGGAAACG		
Acinetobacter baumannii	*Forward*	GATGGATTGGTGCCTTCGGG	178	Unplublished data
	Reverse	GTCGTCCCCGCCTTCCTCC		
Proteus mirabilis	*Forward*	GCGGGGAGGAAGGTGATAAGG	458	Unplublished data
	Reverse	GCGGCCGTACTCCCCAGG		
Stenotrophomonas maltophilia	*Forward*	CGTGCCAGCAGCCGCC	374	Unplublished data
	Reverse	CCAGGCGGCGAACTTAACG		
Pseudomonas oryzihabitans	*Forward*	GCCGCGTGTGTGAAGAAGGTC	501	Unplublished data
	Reverse	GCGGCCGTACTCCCCAGG		
Escherichia coli	*Forward*	ACCAGACCCAGCACCAGATAAG	101	(18)
	Reverse	CTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGA		
Shigella sp	*Forward*	GTCTGATATCTACCCGCTTCGC	82	(18)
	Reverse	AGAACGGTTTGTGGTTAATCAGGA		
Pseudomonas aeruginosa	*Forward*	GCCTCTACCAGTACCTGCTAC	190	(19)
	Reverse	AATAGAACAGCTCCAGCAGG		
Klebsiella pneumoniae	*Foward*	GGCTGTACTACAACGATGAC	931	(20)
	Reverse	TTGAGCAGGTAATCCACTTTG		
Citrobacter freundii	*Forward*	TGTCGAGCAGATGGATGAGCAT	508	(21)
	Reverse	ACGGCTGAAGGTTACGGACCGA		
Salmonella sp.	*Forward*	ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT	243	(21)
	Reverse	AGACGACTGGTACTGATCGATAAT		
Serratia marcescens	*Foward*	TGCCTGGAAAGCGGCGATGG	175	(22)
	Reverse	CGCCAGCTCGTCGTTGTGGT		

Amplification reactions were performed with the following reagent concentrations: reaction buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl 2); 1.0-2.5 μM of each phosphated deoxyribonucleotide (dNTP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); 0.25 μM of each primer oligonucleotide; 1U of AmpliTaq DNA polymerase

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 10-100ng of the template DNA, yielding a final volume of 25ul. The amplification reaction was subjected to the following schedule: 5 minutes at 95 ° C, 35 cycles of 30 seconds at 95 ° C, 45 seconds at 60 ° C, 2 minutes at 72 ° C and an additional extension of 7 minutes at 72 ° C in the brand's thermal cycler Axygen®. After cycling, the products were maintained at 4 ° C until the electrophoresis.

As a positive control were used the strains *Escherichia coli* ATCC 25922; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442; *Proteus mirabilis* LACEN-GO; *Shigella flexneri* ATCC 12022; *Acinetobacter baumannii* CCT 1432; *Hafnia alvei* ATCC 13337; *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048; *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 17666; *Salmonella spp*. LACEN-GO*; Serratia marcescens* ATCC 13380. Electrophoresis of the amplification products was performed on 1.5% agarose gel in 0.5X Tris-Borate-EDTA buffer for 1 hour at 80 V and 1 h: 30 min at 100 V. The gels were visualized after staining with ethidium bromide, photographed under ultraviolet transillumination and captured with the ChemiDoc XRS® photodocumentation system (BioRad Laboratories).

All identified GNB were submitted to the Antimicrobial Susceptibility Test (TSA) by the Müeller-Hinton agar (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England). The antimicrobials were chosen and tested according to the species identified (23).

Isolates phenotypically resistant to beta-lactam agents were subjected to plasmid DNA extraction to detect genes that confer resistance to beta-lactams, following the manufacturer's instructions (FLEXIPREP®, Amersham Pharmacia Biotech). For the identification of GNBs producing beta-lactamase enzymes the conventional PCR technique was used. The primers used in the PCR reactions are listed in Table 2.

Table 2: List of primers used in PCR reactions for detection of beta-lactamase genes.

Beta-lactamase	**Sequence (5'→3')**	***Amplicon***

genes			Size (pb)
bla$_{NDM}$	*Forward*	CGGCCGCGTGCTGGTG	182
	Reverse	GGCATAAGTCGCAATCCC	
bla$_{GIM}$	*Forward*	CGGTGGTAACGGCGCAGTG	149
	Reverse	TGCCCTGCTGCGTAACATCG	
bla$_{SIM}$	*Forward*	GCACCACCGGCAAGCGC	156
	Reverse	TGTCCTGGCTGGCGAACGA	
bla$_{CMY}$	*Forward*	GGATTAGGCTGGGAGATG	158
	Reverse	CCAGTGGAGCCCGTTTTATGC	
bla$_{SPM}$	*Forward*	CGAAAATGCTTGATGGGACCG	147
	Reverse	CACCCGTGCCGTCCAAATG	
bla$_{SME}$	*Forward*	GGCGGCTGCTGTTTTAGAGAGG	184
	Reverse	TGCAGCAGAAGCCATATCACCTAAT	
bla$_{CTX}$	*Forward*	CTGAGCTTAGCGCGGCCG	189
	Reverse	AATGGCGGTGTTTAACGTCGG	
bla$_{SHV}$	*Forward*	ATCTGGTGGACTACTCGCCGGT	144
	Reverse	TCAATCCTGCGGGGCCG	
bla$_{CTX-M}$	*Forward*	GCGGCAGTCGGGAGGCA	132
	Reverse	TTCAGCACCGCGGCCG	
bla$_{TEM}$	*Forward*	TCCGTGTCGCCCTTATTCCC	165
	Reverse	CGGGGCGAAAACTCTCAAGG	
bla$_{DHA}$	*Forward*	GCGGGCGAATTGCTGCAT	183
	Reverse	TGGGTGCCGGGGTAGCG	
bla$_{IMP}$	*Forward*	CCAGCGTACGGCCCACAGA	138
	Reverse	GGTGATGGCTGTTGCGGCA	
bla$_{VIM}$	*Forward*	GTTATGCCGCACCCACCCC	194
	Reverse	ACCAAACACCATCGGCAATCTG	
bla$_{OXA}$	*Forward*	GGCAGCGGGTTCCCTTGTC	171
	Reverse	CGATAATGGGCTGCAGCGG	
bla$_{KPC}$	*Forward*	GGCGGCTCCATCGGTGTG	155
	Reverse	GTGTCCAGCAAGCCGGCCT	

Amplification reactions were performed with the following reagent concentrations: reaction buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl 2); 1.0-2.5 μM of each phosphated deoxyribonucleotide (dNTP); 0.25 μM of each primer oligonucleotide; 1U of AmpliTaq DNA polymerase and 10-100 ng of template DNA, yielding final volume of 25 μL.

The amplification reaction was subjected to the following schedule: 5 minutes at 94 ° C, 35 cycles of 30 seconds at 94 ° C, 45 seconds at 55 ° C, 2 minutes at 72 ° C and

an additional extension of 7 minutes at 72 ° C in the brand thermal cycler Axygen®. PCR reaction products were subjected to 2% agarose gel electrophoresis in 0.5X Tris-Borate-EDTA buffer for 1 hour at 80 V. A 50 bp label was used as the molecular weight standard positioned at the end of the gel. Gels were visualized after staining with ethidium bromide, photographed under ultraviolet transillumination and captured with the ChemiDoc XRS® photodocumentation system (BioRad Laboratories).

The macrosrestriction profile of the isolated *Proteus mirabillis* was determined by PFGE by digestion of the total DNA with the restriction endonuclease *Xba1* using the CHEF DRII apparatus (Bio-RadLaboratories®, Hercules, CA, USA) (24).

Descriptive statistics were used to calculate the prevalence of colonization by Gram negative bacilli and the respective 95 % confidence intervals. Differences in the proportions between contamination present on buses and platforms were compared using the Chi-square test and the risk of contamination was suggested using the Odds ratio test. Values of $P \leq 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSIO

A total of 852 swabs were collected, of which, 720 swabs were obtained from the surfaces of the horizontal and vertical fixed bars of the 90 circulating buses and 132 swabs from the ratchet surfaces on the integration platforms and terminals along the entire “Leste-Oeste” line. There was a growth of 392 colonies of GNB, therefore the prevalence of contamination of the surfaces of the “Leste-Oeste” Line was 46.0%. We believe that this high prevalence of GNB can be justified by the large number of passengers using this system daily. Although this study did not evaluate the microbiological contamination of the users' hands after the use of this system, we can infer that the users of this collective transportation line of the municipality have a risk of

2.3 times (OR: 2.3 - 95% CI 1, 53-3, 42) in contaminating with GNB. In addition, the surfaces surveyed are frequently touched by the passengers, consequently, we can deduce that the surfaces present in the collective public transport system make up the model fomite-hand and hand-fomite.

The identified species are listed in table 3. Bacterial contamination in collective public transport was estimated in buses of collective transportation buses in Curitiba, PR, Brazil. Several bacterial species have been identified, among them *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus saprophyticus* and several enterobacteria such as *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia liquefaciens*, *Salmonella* Typhi, *E. coli* and *H. alvei*. They also concluded that buses that performed inter-hospital routes showed more micro-organisms contamination compared to buses that performed other routes. Despite this difference, the multiresistance profile of the isolated bacteria was not characterized (12).

Table 3: Prevalence of contamination by Gram negative bacilli, collected from the fixed horizontal and vertical bars of the circulating buses and the turnstiles of the platforms and terminals of the collective public transport system line in Central Brazil.

	Collection site		
Species	Bus	Stations/Terminals	Total
A. baumannii	144 (40.8 %)	17 (43.6 %)	161 (41.1 %)
H. alvei	109 (30.9 %)	6 (15.4 %)	115 (29.3 %)
P. mirabilis	92 (26.1 %)	15 (38.5 %)	107 (27.3 %)
E. coli	8 (2.2 %)	1 (2.5 %)	9 (2.3 %)
Total	353 (100.0%)	39 (100.0 %)	392 (100.0 %)

Our results may be related to other studies that also estimated the presence of bacteria in the collective public transport system in other countries. In the United States of America, *S. aureus* were isolated in 68.0% of the analyzed surfaces, such as seats, backs and handrails (15). In addition, *S. aureus* was isolated on surfaces such as seats, handrails, stop buttons and passport machines, in 36.2% of buses under study (25).

These studies can be compared to the present work, since they evidence the human beings as the main disseminators of pathogenic microorganisms for the surfaces present in the collective public transport system of the big cities. Some of the bacterial species isolated in our study, such as *E. coli*, *H. alvei* and *P. mirabilis*, belong to the family *Enterobacteriaceae*. These species make up the intestinal microbiota (26) and are indicators of hygienic-sanitary conditions. Therefore, environments contaminated by these bacteria may reveal inadequate hygienic conditions and inefficacy in the desinfection of these surfaces (12).

We verified the presence of 115 (29.3%) *H. alvei* contaminating the studied surfaces. Contamination by this bacterium in a public public transportation system was also evidenced in 10.0% of the isolated enterobacteria in the public transport systems in Curitiba (12). The dissemination of *H. alvei* has also been related to insect vectors captured in hospitals (27). However, few studies consider the isolation and identification of this bacterium important. Often, even when isolated from clinical specimens, it is not reported as an agent causing infection (28). The underreporting of *H. alvei* supports a bias in the epidemiology of this bacterium (29,30) and hinders the correlation of the results found in this study.

However, some studies have shown its pathogenic potential in patients with weakened immune systems, especially in transplanted patients (28,31). The presence of this bacterium in the motifs of the collective public transport system should not be

disregarded, since there is a demographic tendency for aging of the population and increase of people with weakened immune systems and to ignore the presence of this bacterium can be alarming for this group of risk (30).

Among the 392 isolated GNB, *A. baumannii* was the most prevalent species (41.06%) found contaminating the "Leste-Oeste" line. This information supports the hypothesis that the species *A. baumannii* is disseminated more frequently than the other bacteria, for example, *S. aureus*, *Enterococcus spp* and *P. aeruginosa*. Therefore, *A. baumannii* tends to disperse by contaminating the hands, clothes and fomites present in the environment (32). We believe that some factors may explain the persistence of *A. baumannii* in fomites. The presence of this bacterium as part of the microbiota of the oropharynx, skin and mucosa can contribute to its dissemination in the environment (33).

The tropical and humid climate of the city of Goiânia - GO can also influence the high incidence of *A. baumannii* in comparison to other isolated microorganisms. Some studies show that most of the infections caused by this bacterium in the community occur in the hottest months of the year (34-36) and people with infection may be reservoirs of this microorganism and contribute to the dissemination and contamination of the environment (37).

The role of the community environment acting as reservoir of strains of *A. baumannii* is little explored (38). *A. baumannii* is often associated with surface contamination, but studies that relate *A. baumannii* to contaminated sites are limited to the hospital setting. Several studies have demonstrated this bacterium contaminating surfaces present in the ICU, for example, mechanical ventilation equipment, distilled water containers, nutrition equipment, electrocardiogram machine, among others (39-42). However, the presence of this microorganism contaminating fomites that are frequently

touched is an important fact, since it indicates the survival of this bacterium in diverse environments and not only in the health institutions.

Table 4 shows the susceptibility profile of the isolated species. In a total of 108 *P. mirabilis*, 11 (10.1%) presented resistance to an agent in three or more antimicrobial classes, being characterized as MDR (43). Three isolated were suscetiptible to ciprofloxacin, gentamicin and amikacin were classified as Extensively Drug-resistant (XDR). Among the 09 *E. coli*, 4 (44.4%) only 1 (11.1%) isolated was characterized as MDR. Among all 115 *H. alvei* submitted to TSA, 14 (10.4%) MDR isolates were observed. Our results also showed that 67.0% of isolates of *A. baumannii* were sensitive to the antimicrobials tested. In addition, none of the isolates were characterized as MDR.

Contrary to what is frequently reported in the studies on *A. baumannii* of hospital origin, this species from the community is rarely considered multidrug resistant (44). The prevalence of 8.8% multiresistant bacteria among GNB isolates in this public transport line provides a 4.2x (OR, 4.2; 95% CI, 2.9-5.8) risk of contamination by a GNBMDR when the users touch the analyzed surfaces of the buses and a risk of 0.7 times (OR, 0.7, 95% CI, 0.1-4.1) when touching platform and terminal ratchets.

The presence of these bacteria colonizing fomites in the community is an important fact since this profile of bacteria is considered a specific concern of health institutions. Contact with fomites contaminated by MDR or XDR bacteria may favor colonization of the individual (45). Assuming that colonization by bacteria may predispose the development of infection, consequently being colonized by bacteria with MDR or XDR profile may complicate the treatment of infections, since it limits therapeutic options (46).

Table 4 - Susceptibility profile of GNB isolated from the fixed bars present in the buses and the turnstiles of the platforms and terminals of the collective public transport line in Central Brazil.

Antimicrobials	**Species**			
	E. coli	*P. mirabilis*	*H. alvei*	*A. baumannii*
	Nº (%)			
Ampicilin	(4)44,44	(66)61,68	NT	NT
Cefoxitin	(3)33,33	(39)36,44	NT	NT
Ceftriaxone	(2)22,22	(21)19,62	(48)41,73	(50)31,05
Aztreonam	(2)22,22	(19)17,75	(49)42,6	NT
Ceftazidime	(1)11,11	(14)13,08	(21)18,26	(4)2,48
Cefepime	(1)11,11	(14)13,08	(19)16,52	(2)1,24
Sulfamethoxazole + Trimethoprim	(1)11,11	(7)6,54	(15)13,04	(14)8,69
Ampicillin + Sulbactam	NT	NT	NT	(0)0

Piperacillin + tazobactam	NT	NT	(0)0	NT
Amoxicillin + Clavulanic Acid	(0)0	(5)4,67	NT	NT
Imipenem	(0)0	(3)2,8	(0)0	(0)0
Ertapenem	(0)0	(7)6,54	(1)0,86	NT
Meropenem	(0)0	(3)2,8	(0)0	(0)0
Amikacin	(0)0	(0)0	(0)0	(0)0
Gentamicin	(0)0	(0)0	(0)0	(0)0
Ciprofloxacin	(0)0	(3)2,8	(0)0	(0)0

***NT** - NOT TESTED

One of the *P. mirabilis* with MDR profile originated in a platform which supplies a large hospital in Goiânia - GO. We believe that the fact that buses travel near health institutions can contribute to the spread of MDR bacteria to other urban community environments. This hypothesis was also discussed by other researches (15,25). These authors isolated MRSA from surfaces on buses that traveled on routes near hospitals in the United States and in Portugal, respectively.

31 (7,9 %) isolated were resistants to betalactam. The production of betalactamases and carbapenemases was characterized by the detection of genes encoding these enzymes. Only the bla_{CTX} and bla_{TEM} genes were detected in a total of five isolates (1.3%). We believe that the absence of the beta-lactamase encoding genes in the extracted plasmids occurs due to the lack of selective pressure exerted by the antimicrobials in the community environment.

In the absence of genes encoding beta-lactamases, other mechanisms involving antimicrobial multidrug resistance may be present. In Gram-negative bacteria, mutations can occur in the region of the chromosome that regulates expression of the efflux pump, resulting in overexpression of this mechanism (47). The efflux pump as a promoter of

bacterial resistance has already been found in several GNBs, such as *E. coli, A. baumannii* and *P. mirabilis* (48). Other mechanisms that confer resistance to antimicrobials may also occur, such as alteration of the target region, expression of penicillin binding proteins, and decreased permeability of the outer membrane (49).

The presence of betalactamases genes has also been detected by other authors. In a hospital in France, it was detected the presence of the bla_{OXA-48} gene in strains of *K. pneumoniae* isolated both in patients and in the strains found contaminating sinks and mattresses and even found relationships of genetic similarity between them (50). Additionally, were detected bla_{CTX} and bla_{TEM} type beta-lactamase genes in enterobacteria isolated from seawater samples, used as recreation in Croatia (51). In the city of Rio de Janeiro, Brazil, *K. pneumoniae* and *Enterobacter spp.* were identified in sea waters from different beaches carring of the bla_{TEM} gene, bla_{CTX}, bla_{SHV}, bla_{KPC} and bla_{GES} (52). These studies, as well as our results, confirm the presence of the bla_{CTX} and bla_{TEM} genes in strains found contaminating fomites in community environments. These genes can be transferred between bacterial interactions and spread among the bacteria present in the environment (53).

We evaluated the macrorestriction profiles of the isolated *P. mirabilis*. The results of the PFGE showed a high genetic diversity among the analyzed strains and also the presence of eight clusters, which are not genetically related. We also observed the formation of six clusters (C, D, E, F, G and H) with genetically related strains obtained from different buses and platforms. The presence of genetically related strains of *P. mirabilis* on different buses and between buses and platforms shows that these species have potential for dispersion between different environments.

The PFGE results also showed the presence of three clones circulating in the "Leste-Oeste" line. Clone (3) consists of two strains, one strain originated from bus bars

and the other strain originated from the same platform as where cluster (A) was found. Although clone (3) and cluster (A) are not genetically related, both have strains originating from the platform near a hospital. Cluster (E) also attracted attention because it was formed by an MDR strain and yet by loading the *bla*$_{CTX}$ gene into its plasmid DNA. We believe that these strains with possible hospital origin and the strains with MDR profile have a tendency of dominance in the environment and potential of dispersion in the hospital environment and from this to other community sites. The persistence of these bacteria in the environment may be the precursor in causing outbreaks of contamination and infection (54).

Thus, macrorestriction analysis among *P. mirabilis* strains revealed that some strains tend to be dispersed in the environment. Our analyzes can be compared to the study performed in a hospital in Italy. These authors identified *P. mirabilis* clones colonizing patients hospitalized at the same hospital and also colonizing patients from different hospitals, as well as residents who attended these patients (54).

Our study confirmed the presence of GNBMDR contaminating frequently touched surfaces within buses, platforms and terminals. With this information we conclude that the concern with MDR and XDR bacteria is no longer a problem of health institutions, since these environments are not isolated from the community. Therefore, we suggest further epidemiological studies that reinforce the presence of GNBMDR in the more diverse urban community environments.

REFERENCES

1. Nicas M, Sun G. 2006. A integrated model of infection risk in a healthcare environment. *Risk Anal* 26:1085-1096.

2. Goldmann DA. 2000. Transmission of viral respiratory infections in the home. Pediatr. *Infect. Dis. J* 19:S97-102
3. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 6:130.
4. Oliveira A, Capalonga R, Silveira JT, Tondo EC., Cardoso MRI. 2013. Avaliação da presença de microrganismos indicadores higiênico-sanitários em alimentos servidos em escolas públicas de Porto Alegre, Brasil. Cien Saude Colet 18:955-962.
5. Ho J, Tambyah PA, Paterson DL. 2010. Multiresistant Gram-negative infections: a global perspective. *Curr Opin Infect Dis* 23:546-553
6. Morrill H, Pogue J, Kaye K, LaPlante K. 2015. Treatment options for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Open Forum Infect Dis* 2.
7. Boone SA, Gerba CP. 2007. Significance of fomites in the spread of respiratory and enteric viral disease. *Appl Environ Microbiol* 73:1687–1696.
8. Boone SA, Gerba CP. 2010. The prevalence of human *parainfluenza virus 1* on *indoor* office fomites.*Food Environ Virol* 2:41–46.
9. Bright KR, Boone SA, Gerba CP. 2010. Occurrence of bacteria and viruses on elementary classroom surfaces and the potential role of classroom hygiene in the spread of infectious diseases. *J Sch Nurs* 26:33–41.
10. Angelakis E, Azhar EI, Bibi F, Yasir M, Al-Ghamdi AK, Ashshi AM, Elshemi A. G, Raoult D. 2014. Paper Money and coins as potential vectors of transmissible disease. *Future Microbiol* 9:249-261.
11. Eibitch SJ, Vogel U. 2011. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (*MRSA*) contamination of ambulance cars after short term transport of *MRSA*-colonised patients is restricted to the stretcher. *J Hosp infec 78*: 221-225.

12. Rodrigues APD, Nishi CUM, Guimarães ATB. 2006. Levantamento de bactérias, fungos e formas de resistência de parasitos em duas rotas de ônibus do transporte coletivo de Curitiba, Paraná. RUBS, Curitiba 2:24-31.
13. Yeh PJ, Simon DM, Millar JA, Alexander HF, Franklin D. 2011. A diversity of antibiotic resistant Staphylococcus spp. in a public transportation system. *Osong Public Health Res Perspect* 2:202-209.
14. Iwao Y, Yabe S, Takano T, Higuchi W, Nishiyama A, Yamamoto T. 2012. Isolation and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from public transport. *Med Microbiol Immun* 56:76-82.
15. Lutz JK, Balen JV, Crawford JM, Wilkins JR, Lee J, Nava-Hoet RC. 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in public transportation vehicles (buses): Another piece to the epidemiologic puzzle. *Am J Infect Control* 42:1285-1290.
16. Otter JA, French GL. 2011. Community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as a cause of healthcare-associated infection. *J Hosp Infect* 79:189-193.
17. Pina ECS. 2012. Estudo da suscetibilidade a antibióticos de enterobactérias isoladas nos Hospitais da Universidade de Coimbra: detecção laboratorial de betalactamases. Coimbra: [Dissertação de mestrado Faculdade de Farmácia de Coimbra].
18. Pavlovic M, Luze A, Konrad R, Berger A, Sing A, Bush U, Huber I. 2011. Development of a duplex real-time PCR for differentiation between *E. coli* and *Shigella spp*. *J Appl Microbiol*110:1245-1251.
19. Fazzeli H, Sadighian H, Esfahani BN, Pourmand MR. 2015. Genetic characterization of *Pseudomonas aeruginosa*-resistant isolates at the university teaching hospital in Iran. *Adv Biomed Res* 4: 156.

20. Jeong EU, Lee KS, Heo SH, Seo JH, Choi YK. 2013. Rapid Identification of *Klebsiella pneumoniae, Corynebacterium kutscheri*, and *Streptococcus pneumoniae*, using Triplex Polymerase Chain Reaction in Rodents. *Exp Anim Tokyo* 62:35-40.
21. Lin CL, Chiu C, Chu YC, Huang TY, Lin JT. 2007. A 36 multiplex polymerase chain reaction method for rapid identification of 37 Citrobacter freundii and Salmonella species, including Salmonella Typhi. J. 38 *Microbiol Immunol Infect* 40:222-226.
22. Joyner J, Wanless D, Sinigalliano CD, Lipp EK. 2014. Use of quantitative real-time PCR for direct detection of Serratia marcescens in marine and other aquatic environments. *Appl Environ Microbiol* 80:1679–1683.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. 2016. Performance Standards for Antimicrobial Suscetibility Testing: 26th Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100S26E.
24. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. 2006. Standardization of Pulsed Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O:157 H:7, *Salmonella*, and *Shigella* for Pulsenet. *Foodborne Pathog Dis*3:59-67.
25. Conceição T, Diamantino F, Coelho C, de Lencastre H, Aires de SM. 2013. Contamination of Public Buses with MRSA in Lisbon, Portugal: a possible transmission route of major MRSA clones within the community.*Plos One8*:778-782.
26. Giske CG, Monnet DL, Cars O, Carmeli Y. 2008. ReAct–Action on Antibiotic Resistance. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Ch* 52:813–821.
27. Prado MA, Pimenta FC, Hayashid M, Souza PR, Pereira MS, Gir E. 2002. Enterobactérias isoladas de baratas (*Periplaneta americana*) capturadas em um hospital brasileiro. *Pan Am J Public Health* 11:(2).

28. Stanic M, Hartmann G, Lhotta K. 2015. Case Report: Hafnia alvei Urosepsis in a Kidney Transplant Patient. *Case Reports in Transplantation*.
29. Schuchat A, Hilger T, Zell E, Farley MM, Reingold A, Harrison L, Lefkowitz L, Danila R, Stefonek K, Barrett N, Morse D, Pinner R. 2001. Active bacterial core surveillance of the emerging infections program network. *Emerg Infect Dis*, 7:92-99.
30. Laupand KB, Church DL, Ross T, Pitout JDD. 2006. Population-based laboratory surveillance of Hafnia alvei isolates in a large Canadian health region. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 5. doi:10.1186/1476-0711-5-12
31. Savini V, Di Bartolomeo E, Catavitello C. 2008. Graft versus host disease-related *Hafnia alvei* colonization and probable infection. *J Med Microbiol* 57(9):1167–1169.
32. Morgan DJ, Liang SY, Smith CL, Johnson JK, Harris AD, Furuno JP, Thom KA, Snyder GM, Day HR, Perencevich EN. 2012. Frequent Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Contamination of Gloves, Gowns, and Hands of Healthcare. *Infect Control Hosp Epidemiol* 31(7):716–721. doi:10.1086/653201
33. Fournie PE, Richet H. 2006. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis* 42:692–699.
34. Molina J, Cisneros JM, Ferna´ndez-Cuenca F. 2010. Clinical features of infections and colonization by Acinetobacter Genospecies. *J Clin Microbiol* 48(12):4623-4626.
35. Choi JY, Kim Y, Ko EA.2012. *Acinetobacter* species isolates from a range of environments: species survey and observations of antimicrobial resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis* 74(2):177-180.
36. Oh YJ, Song SH, Baik SH. 2013. A case of fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia in Korea. *Korean J Intern Med* 28(4): 486-90.
37. Denton M, Wilcoxa MH, Parnellc P, Greenc D, Keera V, Hawkeya PM, Evansd I, Murphyd P. 2004. Role of environmental cleaning in controlling an outbreak of

Acinetobacter baumannii on a neurosurgical intensive care unit. *J Hosp Infect* 56:106–110.

38. Zeana C, Larson E, Sahni J, Bayuga SJ, Wu F, Della-Latta P. 2003. The epidemiology of multidrug-resistant *acinetobacter baumannii*: does the community represent a reservoir? *Infect Control Hosp Epidemiol* 24(4):275-279.
39. Hota B. 2004. Contamination, disinfection and cross-colonization: are hospital surface reservoirs for nosocomial infection? Clin. Infect. Dis. 39:1182–1189.
40. Paterson DL. 2006. Resistance in Gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Infect Control*34:S20–S28:S64–S73.
41. Greene C, Vadlamudi G, Newton D, Foxman B, Xi C. 2015. The influence of biofilm formation and multidrog resistance on environment survival of clinical and environment isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Am J infect Control*.
42. Ulger F, Esen S, Dilek A, Yanik K, Gunaydin M, Leblebicioglu H. 2009. Are we aware how contaminated our mobile phones with nosocomial pathogens? *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 8:1-4.
43. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmet G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. 2012. Multidrug resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria:an international expert proposal for interim standard definitions foracquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18: 268-281.
44. Davies J, Davies D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*74: 417-433.

45. Scott E. 2013. Community-based infections and the potential role of common touch surfaces as vectors for the transmission of infectious agents in home and community settings. *Am J Infect Control* 41:1087-1092.
46. Pitout JDD, Laupand KB. 2008. Extended-spectrum [beta]-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 8:159–166.
47. Coyne S, Courvalin P, Perichon B. 2011. Efflux mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter spp*. *Antimicrob. Agents Chemother* 55(3):947–953.
48. Blair JMA, Richmond GE, Piddock LJV. 2014. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiol* 9(10)1165–1177.
49. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Fems Microbiol Lett* 21:538-582.
50. Pantel A, Richaud-Morel B, Cazaban M, Bouziges N, Sotto A, Lavigne J. 2015. Environmental persistence of OXA-48eproducing *Klebsiella pneumoniae* in a French intensive care unit. *Am J Infect Control* 1-3.
51. Maravic A, Skocibusic M, Cvjetan S, Samanic I, Fredotovic Z, Puizina J. 2015. Prevalence and diversity of extended spectrum B lactamase producing Enterobacteriaceae from marine beach waters. *Mar Pollut Bull* 90:60–67.
52. Montezzi LF, Campana EH, Correa LL, Justo LH, Paschoal RP, Silva ILVD, Souza MDCM, Drolshagen M, Picao RC. 2015. Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. *Int J Antimicrob Agents* 45, 174–177.
53. Williams MR, Stedtfeld RD, Guo X, Hashsham SA. 2016. Antimicrobial Resistance in the Environment. *Water Environ Res* 88(10):1951 – 1967.
54. Luzzaro F, Brigantea G, D'Andreab MM, Pini B, Gianib T, Mantengoli E, Rossolini GM, Tonioloa A. 2009. Spread of multidrug-resistant Proteus mirabilis isolates

producing an AmpC-type beta-lactamase: epidemiology and clinical management. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33: 328–333.