

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CÂMPUS DE RIO CLARO

Formigas em ambientes hospitalares: associação com bactérias (patogênicas e endosimbiontes) e modelo de controle.

PRISCILA CINTRA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Zoologia).

RIO CLARO

Estado de São Paulo – Brasil

Fev/2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CÂMPUS DE RIO CLARO

Formigas em ambientes hospitalares: associação com bactérias (patogênicas e endossimbiontes) e modelo de controle.

PRISCILA CINTRA

Orientador: Prof. Dr. Odair Correa Bueno

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Zoologia).

RIO CLARO

Estado de São Paulo – Brasil

Fev/2006

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	4
2. ABSTRACT.....	6
3. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	8
3.1. PRINCIPAIS ESPÉCIES ENCONTRADAS EM AMBIENTES URBANOS	10
3.2. SIMBIOSE ENTRE INSETOS E BACTÉRIAS	11
3.3. PRESENÇA DE FORMIGAS EM HOSPITAIS	16
3.4. BACTÉRIAS PATOGÊNICAS.....	19
3.5. CONTROLE DE FORMIGAS	22
4. OBJETIVOS	25
5. MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1. MATERIAL	26
5.1.1. <i>Formigas e larvas.....</i>	26
5.1.2. <i>Meios de cultura para isolamento e identificação.</i>	27
5.1.3. <i>Iscas.....</i>	28
5.2. MÉTODO	29
5.2.1. <i>Distribuição e identificação das espécies de formigas.....</i>	29
5.2.2. <i>Coleta de formigas</i>	30
5.2.2.1. <i>Formigas adultas de Laboratório</i>	30
5.2.2.2. <i>Larvas.....</i>	32
5.2.2.3. <i>Ambiente hospitalar</i>	33
5.2.3. <i>Coleta das formigas utilizadas para amostragem bacteriológica.....</i>	34
5.2.3.1. <i>Ambiente.....</i>	34
5.2.3.2. <i>Formigas – Análise externa.....</i>	35
5.2.3.3. <i>Formigas adultas – presença de endobactérias</i>	35
5.2.4. <i>Processamento das amostras</i>	36
5.2.5. <i>Identificação dos microrganismos.</i>	36
5.2.6. <i>Caracterização bacteriana dos diferentes ambientes.....</i>	37
5.2.7. <i>Estudos moleculares das bactérias presentes em T. melanocephalum.....</i>	38
5.2.7.1. <i>Extração de DNA bacteriano.....</i>	38
5.2.7.2. <i>Amplificações</i>	38
5.2.7.3. <i>Purificação dos produtos de PCR.....</i>	39
5.2.7.4. <i>Seqüenciamento</i>	39
5.2.7.5. <i>Análise dos resultados.....</i>	39
5.2.8. <i>Controle da infestação de formigas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu.</i>	40
6- RESULTADOS	41
6.1. <i>COLETA E IDENTIFICAÇÃO DAS FORMIGAS.</i>	41
6.2. <i>OCORRÊNCIA DE FORMIGAS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNESP – BOTUCATU.</i>	43
6.3. <i>BACTÉRIAS ISOLADAS DAS FORMIGAS E RESPECTIVOS LOCAIS DE COLETA.</i>	50
6.4. <i>OCORRÊNCIA DE FORMIGAS NO CENTRO DE SAÚDE DE SÃO CARLOS.</i>	53
6.5. <i>BACTÉRIAS ISOLADAS DAS FORMIGAS E RESPECTIVOS LOCAIS DE COLETA.</i>	55
6.6. <i>BACTÉRIAS ISOLADAS DO TRATO DIGESTÓRIO DE FORMIGAS DE LABORATÓRIO.</i>	63
6.7. <i>BACTÉRIAS ISOLADAS DOS NINHOS DE LABORATÓRIO</i>	64
6.8. <i>BACTÉRIAS ISOLADAS DAS LARVAS DE FORMIGAS</i>	65
6.9. <i>CARACTERIZAÇÃO BACTERIANA DOS DIFERENTES LOCAIS DE ISOLAMENTO</i>	67
6.10. <i>ESTUDOS MOLECULARES DAS BACTÉRIAS PRESENTES EM T. MELANOCEPHALUM.....</i>	71

6.11. CONTROLE DE FORMIGAS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNESP – BOTUCATU.....	74
7 . DISCUSSÃO	75
8. CONCLUSÕES.....	82
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
10- ÍNDICE DE FIGURAS	96
11- ÍNDICE DE TABELAS.....	99

1. RESUMO

As formigas podem adquirir bactérias presentes no ambiente e permitir que elas se desenvolvam nos seus tratos digestórios, transmitindo-as para as formas mais jovens. Estudos filogenéticos, com formigas do gênero *Camponotus*, apontam uma co-evolução das espécies de bactérias e de formigas, indicando também uma transmissão maternal. As formigas andarilhas, ou “tramp species”, podem ocorrer em diversos ambientes, entre eles os hospitais, podendo atuar como carreadores de bactérias patogênicas. Não existem na literatura trabalhos que relatem bactérias patogênicas no trato digestório de formigas que ocorrem em ambientes urbanos.

O objetivo do presente trabalho foi o de verificar a existência de bactérias patogênicas no trato digestório de formigas que ocorrem em ambientes hospitalares, determinar se essas espécies poderiam funcionar como reservatórios de bactérias e comparar com as bactérias isoladas de formigas de laboratório. Os resultados obtidos indicaram que as formigas não apresentam bactérias patogênicas em seus tratos digestórios, mesmo sendo coletadas em ambiente hospitalar, porém estas podem eventualmente ser isoladas, não fazendo parte da microbiota natural dessas espécies.

Bactérias patogênicas foram isoladas nos ninhos mantidos em laboratórios e também nas larvas das espécies *Monomorium pharaonis* e *Monomorium floricola*. Devido às diferenças morfológicas entre o trato digestório das operárias adultas e larvas, pode ser explicada a distinção encontrada entre a microbiota isolada.

Foram realizados o levantamento da distribuição das espécies de formigas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu, SP, e no Centro de Saúde de São Carlos, bem como o isolamento das bactérias presentes no trato digestório dos exemplares coletados.

Como não foram isoladas bactérias patogênicas, técnicas de biologia molecular foram utilizadas, para identificação de bactérias presentes que não

pudessem ser isoladas segundo a metodologia inicialmente proposta. Foi realizada a extração do DNA de formigas esterilizadas da espécie *Tapinoma melanocephalum* e o sequenciamento do DNA bacteriano, que posteriormente foi comparado às seqüências do Gene Bank, verificando a presença da bactéria endossimbionte *Wolbachia* sp., que é amplamente distribuída em várias espécies de formigas e artrópodes. Paralelamente, foi testado um modelo de controle para a população de formigas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu, que resultou na redução da taxa de infestação, para índices abaixo de 10%. O modelo proposto consiste no monitoramento multipontual e distribuição de iscas, e segundo os resultados obtidos é eficiente para controle de espécies de formigas em ambientes hospitalares.

2. ABSTRACT

Ants can collect bacteria from environment and led them develop and reproduce in their digestive tracts, transmitting them to young forms. Phylogenetic studies with ants of *Camponotus* genera, pointed the coevolution between ant and bacteria species, indicating also maternal transmission. Tramp species are ant species that live in close association with man and occur in several environments, like hospitals. There is no works in literature about pathogenic bacteria isolated from digestive tract of ants collected in urban environments.

The objective of present work were to verify the presence of pathogenic bacteria in digestive tract of ants collected at hospitals, and determine if these species can act as bacterial reservatories, comparing them with laboratory ants. The results obtained indicated that ants don't presented pathogenic bacteria in their digestive tracts, even those ants collected at hospitalar environment. But, these bacteria could be eventually isolated, don't being part of the natural gut microflora of these species. Pathogenic bacteria were also isolated from colonies maintained in laboratory conditions and from *M. pharaonis* and *M. floricola* larvae. Based at the differences between digestive tracts of adults and larvae workers, we could suppose that gut microflora founded would be distinct.

A survey was made about ant species presents and their distribution at HC from UNESP Botucatu, SP and a survey was made at another Hospital, at São Carlos, SP. Ants collected at both hospitals were utilized in microbiological experiments to verify the gut microflora.

Utilizing molecular procedures of DNA extraction and PCR (Polymerase Chain Reaction), we could sequence DNA from bacteria that were not isolated by commom microbiological methodology. Were utilized sterile ants from *T. melanocephalum* species, and sequences obtained were compared with those from Gene Bank, being the same of *Wolbachia* sp., an endosymbiont widely distributed among several species of arthropods.

At the same time, was tested a control method for ants at HC from UNESP-Botucatu, decreasing the initial infestation rate of 32%, to a rate minor than 10%. The proposed model consisted at multipunctual survey and toxic baits distributed among the hospital. According with obtained results, it is efficient to control ants species in hospitalar environments.

3. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Apesar de influenciarem aspectos ecológicos na biosfera, os ecossistemas urbanos têm sido negligenciados na pesquisa ecológica. Os artrópodes são abundantes nesses ambientes, mas pouco se sabe sobre como esses animais têm respondido à urbanização (McINTYRE, et. al., 2001).

Embora a ocorrência de formigas nas áreas urbanas seja restrita a poucas espécies, entre vinte a trinta no máximo, os prejuízos causados podem ser grandes, pois vivem em íntima associação com o homem e podem causar problemas quando ocorrem em fábricas de alimento, biotérios, hospitais e padarias. Dentro das residências, causam incômodo e provocam danos em equipamentos eletrodomésticos (BUENO e CAMPOS- FARINHA, 1999a).

O problema da ocorrência de infecções hospitalares vem sendo objeto de preocupações e estudos no mundo todo. As formigas foram descritas como vetores mecânicos de bactérias patogênicas pela primeira vez na Inglaterra (BEATSON, 1972), e posteriormente por Eicheler (1990) na Alemanha. As espécies de formigas de grande ocorrência no ambiente hospitalar já foram relatadas por Ipinza-Regla et al. (1981) no Chile, por Chadee e Maitre (1990) em Trinidad e por Fowler et al. (1993) no Brasil. Em todos estes casos, as formigas podem atuar como vetores mecânicos, transportando as bactérias sobre o seu corpo.

Estudos realizados com o trato digestório de algumas espécies de formigas revelaram a presença de uma rica flora bacteriana que poderia exercer função simbiote (SAUER et al., 2000, BILLEN e BUSCHINGER, 2000). Jaffé et al. (2001) sugeriram a hipótese de que os microrganismos encontrados no intestino de formigas do gênero *Cephalotes* forneceriam nutrientes para as formigas através da síntese de aminoácidos. Não é conhecido quando e como as formigas adquirem as bactérias do meio ambiente, mas elas as transmitem para as formas jovens. Elas cultivam as bactérias em seus tratos digestórios e, eventualmente as utilizam como alimento. Não há na literatura trabalhos que mostrem bactérias no trato digestório de formigas que ocorrem em ambiente urbano ou hospitalar; porém, estas podem estar coletando bactérias no ambiente, e permitindo que ocorra desenvolvimento nos seus tratos digestórios.

No caso de infestação por formigas nestes ambientes, os inseticidas empregados de forma tradicional (sprays, líquidos ou pós) não funcionam para espécies de pequeno tamanho e poligínicas, e geralmente produzem problemas maiores dos que os apresentados anteriormente ao início do tratamento. As principais espécies encontradas em hospitais são exóticas e apresentam populações unicloniais, que podem estar representadas em vários pontos do hospital (BUENO e FOWLER, 1994).

3.1. Principais espécies encontradas em ambientes urbanos

Algumas espécies de formigas são neutras em relação aos aspectos econômicos da humanidade. Porém, as formigas em geral exercem um papel de grande importância nos ecossistemas pela ação de aeração e movimentação do solo, como também de decomposição de substâncias orgânicas, colaborando com a ciclagem de nutrientes (HOLDOBLER e WILSON, 1990). Existem também as formigas andarilhas ou “tramp species”, que vivem em íntima associação com o homem e são distribuídas por todo o mundo (PASSERA, 1994).

A maioria de espécies de formigas nas áreas urbanizadas não apresenta comportamento agressivo intra-específico, o que permite formar uma estrutura social do tipo unicolonial, na qual operárias e rainhas podem se deslocar entre ninhos sem agressão (CHEN e NONACS, 2000). Este tipo de estrutura social é comum em espécies de formigas introduzidas que se tornaram praga como *Anoplolepis longipes*, *Cardiocondyla emeryi*, *Monomorium pharaonis*, *Wasmannia auropunctata*, *Paratrechina longicornis*, *Pheidole megacephala*, *Tapinoma melanocephalum* e *Linepithema humile*, entretanto esse comportamento é raro nas espécies nativas (CHEN e NONACS, 2000).

A espécie *Monomorium pharaonis* é, provavelmente, originária do Norte da África e foi transportada acidentalmente pelo homem para muitas partes do mundo através do comércio marítimo (ROBINSON, 1996). Geralmente, a fundação de novas colônias dessa espécie ocorre através da sociotomia ou fragmentação da colônia, com a disseminação de indivíduos de diferentes estágios do desenvolvimento levados pelas operárias, com ou sem rainhas (BERNDT e EICHELER, 1987). Fazem ninhos em diversos locais podendo infestar aparelhos eletrônicos e outros eletrodomésticos, e não apresentam vôo nupcial (BUENO e CAMPOS –FARINHA, 1999a).

Monomorium floricola, pertencente à família Myrmicinae, é considerada uma das principais espécies exóticas presentes nas cidades brasileiras (BUENO e CAMPOS –FARINHA, 1999a).

Outras formigas de ocorrência em ambientes urbanos são da espécie *T. melanocephalum*, que é originária da África tropical e recebe a denominação popular de formiga fantasma. Seus ninhos são construídos tanto fora como dentro das casas, são pouco estruturados e mudam constantemente de local, provavelmente pela migração de uma ou mais rainhas acompanhadas de operárias. Sua preferência é por alimentos adocicados e tem mostrado ser uma importante praga no Sudeste do Brasil (CAMPOS-FARINHA et al., 1997; BUENO e CAMPOS-FARINHA, 1998; 1999a, 1999b).

A espécie *P. longicornis* (formiga-louca) também é originária da África Tropical. Geralmente essas formigas constroem seus ninhos fora dos prédios e entram à procura de alimento formando trilhas com operárias que andam de maneira irregular, o que originou o seu nome popular. Também aboliram o vôo nupcial e o acasalamento ocorre na entrada do ninho (BUENO e CAMPOS – FARINHA, 1999a).

O gênero *Camponotus* (formiga carpinteira) tem espécies nativas do Brasil, embora seja cosmopolita, e abrangem mais de 900 espécies dificilmente identificadas. São polimórficas e podem fazer seus ninhos em cavidades ou preferencialmente em árvores, batentes de portas e janelas, rodapés ou dentro de gavetas e forros de madeira. Possuem ninhos satélites e tem preferência por substâncias adocicadas, podendo também se alimentar de pedaços de carne (BUENO e CAMPOS – FARINHA, 1999a).

3.2. Simbiose entre insetos e bactérias

O termo simbiose (do grego *simbios* ou vivendo juntos) foi primeiramente introduzido por Anton de Bary em 1879, como uma “associação permanente entre dois ou mais organismos distintos específicos, pelo menos em parte do ciclo de vida” (ROSÁRIO et al., 2004).

O gênero *Wolbachia* compreende o grupo das mais abundantes bactérias endossimbiontes, e foi primeiramente descoberta no mosquito *Culex pipiens* (HERTIG e WOLBACH, 1924). Estima-se que ocorra em 20 a 75% de todas as espécies de insetos (JEYAPRAKASH e HOY, 2000). As primeiras

observações estruturais descrevem a *Wolbachia* como pequena (0,5 a 1,5 μm) e pleomórfica, de forma esférica e alongada (TAYLOR et al., 1999).

Nos insetos infectados, a *Wolbachia* é detectada em quase todos os tecidos, mas não no esperma. As infecções por *Wolbachia* são maternas herdadas através da transmissão das fêmeas para seus ovos antes da oviposição (MORAN e BAUMANN, 1994).

O parasitismo reprodutivo pode evoluir quando a infecção bacteriana é herdada através de um único sexo da população hospedeira. Portanto, a pressão seletiva direta no simbionte ocorre somente através do sexo que é responsável pela transmissão. Como a *Wolbachia* é maternas transmitida para os embriões através do citoplasma da fêmea hospedeira, os machos são um final evolucionário para as infecções de *Wolbachia*, e não há seleção direta para a simbiose benéfica em machos infectados. Pelo contrário, exemplos mostram que as infecções por *Wolbachia* diminuem o desempenho dos machos: incompatibilidade citoplasmática (HOFFMAN e TURELLI, 1997), morte de machos (HURST et al., 1991), partenogênese (STOUTHAMER et al., 1993) e feminização (ROUSSET et al., 1992).

A incompatibilidade citoplasmática é a manipulação reprodutiva que mais tem atraído a atenção dos cientistas. Em insetos hospedeiros haplodiploides com partenogênese arrenótoca, a indução de perda de cromossomos paternos resulta em crias de machos somente (DOBSON e TANOUYE, 1998).

Embora os mecanismos de ação do sistema de incompatibilidade citoplasmática não estejam completamente esclarecidos, já foram realizados trabalhos aplicados que utilizam mosquitos de importância médica, como *Culex quinquefasciatus* (*C. pipiens fatigans* Wiedemann), transmissor da filariose. Machos com incompatibilidade citoplasmática foram soltos repetidamente numa população relativamente isolada, com a intenção de reduzir a reprodução do vetor e interromper a transmissão da doença. Os ovos foram coletados no campo e monitorados para a emergência. Durante o período do experimento, a emergência caiu de 95,7 para 0% (LAVEN, 1967). O sucesso dessa estratégia para a supressão de populações no campo leva à determinação de adaptação

da metodologia para alvos adicionais, incluindo espécies de pragas economicamente importantes (BROWER, 1979).

O gênero *Wolbachia* já foi encontrado em mais de 90 espécies de formigas (WHENSELEERS et al., 1998, JEYAPRAKASH e HOY, 2000), incluindo algumas espécies classificadas como pragas urbanas, como *P. longicornis*, *M. floricola*, *M. pharaonis*, *Linepithema humile* e *T. melanocephalum*.

Em uma análise realizada com a espécie *L. humile*, foi possível verificar que existem duas diferentes linhagens de *Wolbachia*, que teriam se tornado especializadas em formigas do Novo Mundo e do Velho Mundo. Foi sugerido também que a *Wolbachia* não seria especializada em grupos taxonômicos. Porém, o fato de terem sido avaliadas somente formigas provenientes de laboratório pode não refletir a identidade da *Wolbachia* em populações naturais. No entanto, praticamente nada é conhecido a respeito da interação entre a bactéria e seus hospedeiros, as causas e conseqüências da infecção, os modos de transmissão bacteriana dentro de uma mesma espécie ou em espécies diferentes (TSUTSUI et al., 2003).

A ausência de *Wolbachia* na maioria das populações introduzidas de três espécies de formigas (*L. humile*, *S. invicta* e *S. richteri*) confirma a hipótese de que estes patógenos pudessem limitar o sucesso das invasoras (WHENSELEERS et al., 2002).

Algumas formigas apresentam bactérias intracelulares simbióticas nas suas células epiteliais do intestino médio, denominadas bacteriócitos e acredita-se que esses simbiontes sejam derivados de um ancestral comum. Baseados em dados moleculares, foram construídas árvores filogenéticas para caracterizar a posição sistemática dos simbiontes e estimar a relação entre eles e seus hospedeiros. As análises mostraram que os endosimbiontes aparecem conectados com a Família Enterobacteriaceae, mas não constituem um grupo monofilético, enquanto em três gêneros da Tribo Camponotini (*Camponotus*, *Colobopsis* e *Polyrhachis*), os endosimbiontes e seus hospedeiros formam um agrupamento. Isso levou à conclusão de que os endosimbiontes das formigas tiveram origens múltiplas, e que em Camponotini,

simbiontes ancestrais coevoluíram com seus hospedeiros (SAMESHIMA et al, 1999).

É estimado que pelo menos 15 a 20% de todos os insetos vivam em simbiose com microrganismos (BUCHNER, 1965), cujas relações estão devidamente registradas na literatura (DASH et al., 1984, DOUGLAS, 1989, CORSARO et al., 1999). Segundo Pereira e Stimac (1997), bactérias associadas com formigas podem ser divididas em três classes: associações não patogênicas com adaptações ecológicas no desenvolvimento do ninho, patógenos verdadeiros encontrados infectando as formigas e patógenos de outros insetos introduzidos nas formigas.

Schröder et al. (1996) caracterizaram as bactérias endosimbiontes presentes no gênero *Camponotus*, onde os bacteriócitos são encontrados no ventrículo, em rainhas e operárias. Eles apresentam uma morfologia diferente das células epiteliais normais e carregam um grande número de bactérias Gram-negativas livres no citoplasma. Tais bactérias não são observadas em células epiteliais próximas, mas são encontradas intracelularmente em ovócitos, evidenciando claramente a transmissão maternal das bactérias. A árvore filogenética dos endossimbiontes das formigas reflete a classificação sistemática e a distribuição geográfica de seus insetos hospedeiros, indicando uma co-evolução muito próxima à de seus endossimbiontes e uma transmissão vertical das bactérias.

A presença de endosimbiontes em formigas foi relatada pela primeira vez em *Camponotus ligniperda* e *Formica fusca* (Formicini) por Blochmann (1892), que descreveu uma forte associação entre as bactérias encontradas nos tecidos do intestino médio e nos ovários dessas formigas. Muitos gêneros da subfamília Formicinae são conhecidos como hospedeiros de bactérias, incluindo *Camponotus*, da tribo Camponotini, o gênero *Formica* da tribo Formicini, e o gênero *Plagiolepis*, na tribo Plagiopedini (BUCHNER, 1965, DASH et al., 1984).

Os endosimbiontes são restritos às células do hospedeiro caracterizadas pela morfologia e localização particulares, denominadas micetócitos. Eles são observados principalmente em sete ordens de insetos: Blattaria, Hemiptera,

Anoplura e Coleoptera e em algumas ordens de Mallophaga, Diptera e Hymenoptera (DOUGLAS, 1989). Nesta última, a tribo Camponotini que reúne 14 gêneros, a endossimbiose nos micetócitos parece ser comum entre eles (DASH et al., 1984).

Billen e Buschinger (2000) caracterizaram morfológicamente e ultra-estruturalmente uma câmara presente exclusivamente no trato digestivo de formigas do gênero *Tetraponera* denominada de bolsa bacteriana. O suprimento traqueolar conspícuo ilustra a atividade metabólica na bolsa, enquanto a diferenciação microvilosa encontrada no epitélio cilíndrico da sua parede proximal pode ser interpretada na captura de metabólitos provenientes do lúmen da bolsa. O significado funcional desta estrutura não foi determinado, embora a presença de uma grande quantidade de bactérias indique uma função simbiótica.

Yurman e Dominguez-Bello (1993) caracterizaram a microflora fermentativa do trato digestório de formigas das espécies *Cephalotes atratus* e *Zacryptocerus pusillus*. Indivíduos de ambas as espécies apresentaram uma densidade de 10^5 bactérias por grama de órgão digestivo (ventrículo, íleo e reto). As linhagens de bactérias eram na maioria anaeróbias facultativas e produtoras de H_2S e não apresentam atividades celulósicas ou degradantes de ácido úrico. A presença de microrganismos no ventrículo de *C. atratus* e *Z. pusillus* foi anteriormente reportada por Caetano e Cruz-Landim (1985).

Jaffé et al. (2001) identificaram mais de dez tipos de microrganismos diferentes presentes no intestino de *Cephalotes pusillus* (Cephalotini) com resistência a diferentes tipos de antibióticos (nistatina, penicilina, e ampicilina). As bactérias encontradas pertencem aos gêneros *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Sphingobacterium*, *Ochrobactrum*, *Myroides*, *Brevundimonas*, *Alcaligenes*, *Stenotrophomonas*, *Moraxella* e *Pseudomonas*. Tais bactérias são comumente encontradas vivendo livres no solo, o que sugere que as formigas, provavelmente alimentam-se das bactérias encontradas nas superfícies foliares e no solo e estas se reproduzissem em seus tratos digestórios.

A filogenia das bactérias e de seus hospedeiros do gênero *Camponotus* apresenta um alto nível de congruência, fornecendo evidências significativas da

co-especiação das bactérias e das formigas e a transmissão maternal de simbiontes (SAUER et al., 2000).

Operárias e rainhas de *Solenopsis invicta* foram submetidas à alimentação com dieta repleta de bactérias para a avaliação de quais seriam ingeridas. Foram utilizadas as bactérias *Serratia marcescens*, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* e todas foram excluídas do intestino de operárias e rainhas (JOUVENAZ et al., 1996). No entanto, foram determinadas relações entre formigas dessa espécie e outros tipos de microrganismos, presentes como parte de sua microbiota interna. Foram isoladas 5 espécies de leveduras: *Candida parapsilosis*, *Candida lipolytica*, *Candida guilliermondii*, *Candida rugosa* e *Debaryomyces hansenii*, na hemolinfa dos adultos e no mecônio de larvas, sugerindo função nutricional e uma associação não ocasional. Os dados também indicaram que a presença de leveduras não diminuiu a biomassa das colônias (BA e PHILLIPS, 1996).

A demonstração inequívoca dos efeitos cooperativos da microbiota do intestino dos insetos requer o uso de métodos microbiológicos quantitativos utilizando-se de modelos “in vivo”, o que limita o trabalho. Avanços nos estudos da diversidade microbiana no trato digestório dos insetos resultaram na detecção de várias novas espécies, porém a população endógena deve ser distinguida da transitória. A caracterização da microbiota deve ser relacionada ao seu papel biológico, porque mesmo se houver grande variação entre a composição e o tamanho da população de bactérias entre insetos individualmente, deve haver estabilidade funcional (DILLON e DILLON, 2003).

3.3. Presença de formigas em hospitais

Alguns dos problemas causados pelas formigas em ambientes hospitalares incluem vários tipos de irritações e lesões na pele, além de causar rejeição psicológica e poder falsear resultados laboratoriais ao passarem de uma placa para a outra (EICHELER, 1990).

Além da presença de bactérias endossimbiontes em formigas de vários gêneros, podem ser encontrados na literatura trabalhos que indicam que elas poderiam atuar como vetores mecânicos de bactérias. Tal fato foi inicialmente demonstrado por Beatson (1972) e mais tarde por Edwards e Baker, (1981), na Inglaterra. Foi relatado por Ipinza-Regla et al. (1981) no Chile, por Eicheler (1990), na Alemanha, por Chadee e Maitre (1990) em Trinidad e por Fowler et al. (1993), Peçanha (2000) e Zarzuela et al. (2005), no Brasil.

No Hospital Central da Santa Casa de São Paulo, análises de 50 formigas revelaram que em 90% dos casos foram encontradas bactérias causadoras de infecção hospitalar, entre as quais estão *Bacillus subtilis* (33,4%), *Citrobacter* (26,6%), *Enterobacter* (11,1%), *Proteus* (4,5%) e *Serratia* (4,5%) (MIMICA et al., 1984).

A formiga-do-faraó (*M. pharaonis*), como resultado de sua intensa atividade, pode servir como vetor mecânico de doenças. Elas coletam germes no ambiente ou consumindo os corpos de vespas, baratas e moscas mortas. Podem ser encontrados em formigas provenientes de hospitais: *Streptococci*, *Enterococci*, *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, *Micrococcus* var. *albus*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* e *Alcaligenes faecalis* (EICHELER, 1990).

Outros estudos realizados com a mesma espécie demonstraram que tais formigas podem ser vetores de um grande número de bactérias, incluindo as patogênicas como *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella ozaenae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Yersinia pestis* (HUGHES et al, 1989). Podem também estar associadas à transmissão mecânica de *Pasturella pestis* depois de se alimentar em animais contaminados por peste bubônica (ALEKSEEV et al., 1972).

Num hospital de Trinidad, quatro espécies de formigas foram coletadas e identificadas como: *M. pharaonis*, *T. sessile*, *S. molestus*, e *Solenopsis* sp. (CHADEE e MAITRE, 1990). Segundo Bueno e Fowler (1993), as espécies dominantes encontradas em hospitais do Brasil eram formigas exóticas e no maior hospital estudado *T. melanocephalum* foi a espécie predominante, sendo que *P. longicornis* foi a segunda espécie mais encontrada.

São conhecidas 23 espécies de formigas em hospitais públicos de Ilhéus e Itabuna (BA, Brasil), sendo 9 exóticas (DELABIE et al., in: Fontana, 1999). A maioria ocorre também nas habitações da mesma região (DELABIE et al., 1995). Um pouco menos da metade dos ambientes hospitalares revelaram a presença de *T. melanocephalum* e cerca de 10% dos ambientes amostrados são também visitados por *Solenopsis globularia* ou *S. geminata* em Ilhéus, enquanto são mais freqüentados por *Pheidole megacephala* em Itabuna. Os resultados preliminares do estudo em hospitais nesta região indicaram que 26,7% das formigas (*P. longicornis*, *P. megacephala* e *T. melanocephalum*) eram portadoras de bactérias potencialmente patogênicas. Os microrganismos associados às formigas foram: *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus* spp., *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulase negativos (ECN) e *Streptococcus viridans* (FONTANA et al., 1999).

Nos 2 hospitais que compõem o Conjunto Hospitalar de Sorocaba, SP., foram realizadas coletas de formigas por Peçanha (2000). O Hospital A apresentou menor diversidade de formigas, predominando a espécie *C. atriceps*, de hábito essencialmente noturno. O Hospital B apresentou maior diversidade de espécies de formigas, sendo verificadas 7 espécies distintas: *T. melanocephalum*, *P. longicornis*, *M. pharaonis*, *Brachymyrmex* sp., *M. floricola*, *Camponotus* sp., e *Crematogaster* sp. As bactérias carreadas pelas formigas (66,7% das cepas isoladas eram Gram negativas) apresentaram níveis de resistência quantitativamente e qualitativamente mais elevados que as bactérias recuperadas do ambiente, indicando as formigas como possíveis vias de dispersão de resistência dentro do ambiente hospitalar.

No mesmo ano, foi realizado por Terossi (2000) um monitoramento de formigas no Hospital "Sociedade Operária Humanitária" em Limeira SP. Foram identificadas 7 espécies de formigas nativas do Brasil: *Camponotus rufipes*, *C. atriceps*, *Wasmannia auropunctata*, *Pheidole* sp.1 e sp.2, *Brachymyrmex* sp., e *Solenopsis* sp., além de 3 espécies exóticas: *M. floricola*, *P. longicornis* e *T. melanocephalum*. Houve a predominância de *P. longicornis* na área externa e de *M. floricola* no interior do conjunto hospitalar.

O levantamento por meio de iscas não tóxicas revelou a presença de 10 espécies de formigas em um pequeno hospital no Estado de São Paulo. A espécie mais abundante foi *M. floricola*, seguida de *P. longicornis*. Ambas distribuíram-se em vários setores, sendo que onde a densidade de *M. floricola* era maior, não eram encontradas exemplares da espécie *P. longicornis*, embora o contrário não ocorresse. *L. humile* foi encontrada na área externa e sua ocorrência excluiu outras espécies de formigas (ZARZUELA et al., 2002).

Formigas das espécies *T. melanocephalum* e *P. longicornis*, coletadas em residências e cozinhas industriais, também foram avaliadas microbiologicamente para avaliar o potencial de transporte de bactérias patogênicas. Foram isoladas bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (ZARZUELA et al., 2005).

3.4. Bactérias patogênicas

As infecções hospitalares ou infecções nosocomiais (origem grega: *nosos*: doença, *komeion*: tomar cuidado) são infecções adquiridas no hospital, não – manifestas ou fora do período de incubação no ato da admissão, a menos que estejam relacionadas à internação prévia no mesmo hospital (MARTINS, 1989). As espécies bacterianas mais freqüentemente encontradas como responsáveis por infecções hospitalares são agrupadas como bacilos Gram negativos e cocos Gram positivos (SILVA, 1999).

Dentre as bactérias Gram positivas, o *Staphylococcus aureus* é o principal agente etiológico, sendo encontrado nas regiões nasal, orofaríngea e nas mãos. Os membros do gênero *Staphylococcus* são catalase positivos, medindo de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro. São amplamente distribuídos na natureza, sendo principalmente encontrados na pele, glândulas da pele e membranas mucosas de mamíferos e pássaros. As linhagens de *S. aureus* que são coagulase positivas são bem documentadas como patógenos humanos oportunistas. Como um patógeno nosocomial, *S. aureus* é o maior responsável pela mortalidade de pacientes. As infecções que podem ser produzidas incluem bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite aguda, pericardite e

abscessos nos músculos, trato urogenital, sistema nervoso central e vários órgãos intra- abdominais (KLOOS e BANNERMAN, 1995).

O *Staphylococcus* coagulase-negativo (ECN), anteriormente considerado apenas um contaminante comum da pele, hoje representa um patógeno importante na sepse associada ao cateter vascular e à nutrição parenteral (MARTINS, 1989). São componentes da microflora humana normal. Pode estar associado com infecções, especialmente a espécie *S. epidermidis*, causando bacteremias, infecções cardíacas, infecções no sistema nervoso central, em próteses e artefatos ortopédicos (KLOOS E BANNERMAN, 1995).

As bactérias Gram positivas do gênero *Streptococcus* catalase negativas, apresentam forma esférica ou ovóide e possuem menos de 2 µm de diâmetro. São comumente encontrados como flora normal em humanos e outros animais, colonizando a pele e membranas mucosas, podendo ser isolados como parte da flora normal de tratos digestório, respiratório e genital. A espécie *S. pneumoniae* é um importante agente da pneumonia comunitária, que pode ser acompanhada de bacteremia (RUOFF, 1995).

Os enterococos representam outro importante grupo de bactérias Gram positivas, sendo responsáveis por bacteremias, endocardites, infecções urinárias e meningite (HUNT, 1998). Cerca de 80 a 90% das infecções provocadas pelo gênero *Enterococcus* são causadas por *Enterococcus faecalis* (RUBIN et al., 1999). Podem persistir em quase todos os ambientes, sendo encontrados no solo, alimentos, água, animais, pássaros e insetos. Em humanos habitam o trato gastrointestinal e genitourinário (FACKLAM e SAHM, 1995).

A família Bacillaceae compreende um grupo muito diverso de bactérias formadoras de esporos, e os dois principais gêneros são *Bacillus* e *Clostridium*. O gênero *Bacillus* inclui 51 espécies descritas e muitas outras adicionais de taxonomia incerta. As células são Gram positivas ou Gram variáveis, medindo de 0,5 a 1,2 µm de largura e 2,5 a 10 µm de comprimento, ocorrendo solitárias ou em cadeias que podem ter muitas células. As espécies de *Bacillus* são saprófitas e estão distribuídas na natureza, particularmente no solo, de onde se espalham através do pó e da água, e em materiais oriundos de plantas e

animais. A maioria das espécies de *Bacillus* tem pouco ou nenhum potencial patogênico, sendo raramente associadas com doenças no homem ou animais. As principais exceções são o *B. anthracis*, causador do antraz e o *B. cereus*, causador de intoxicações alimentares (TURNBULL e KRAMER, 1995).

Em decorrência de estresse de diferentes origens, pacientes hospitalizados são particularmente sensíveis à colonização e à infecção por bacilos entéricos Gram negativos. As espécies de enterobactérias mais freqüentemente implicadas pertencem aos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Serratia* (BIANCALANA e BORTOLETTO, 1997).

Os organismos da família Enterobacteriaceae são Gram negativos, e incluem os seguintes gêneros de importância clínica: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Serratia*, *Klebsiella* e *Proteus*, entre outros. Estão amplamente distribuídos em plantas e no solo, água e intestinos de humanos e animais. Linhagens de Enterobacteriaceae são associadas com abscessos, pneumonias, meningites, sepses e infecções de feridas, trato urinário e intestinal. São os maiores componentes da flora intestinal normal e relativamente não comuns em outras partes do corpo (FARMER III, 1995).

A espécie *Serratia marcescens* é considerada importante patógeno humano em infecções do trato urinário, feridas cirúrgicas, pneumonia, meningites e bacteremias (BERTHELOT et al., 1999).

O gênero *Citrobacter* possui cinco espécies, sendo que a melhor caracterizada é *C. freundii*, responsável por sepses e infecções de vários tecidos (EWING E DAVIS, 1986). Duas espécies do gênero *Enterobacter* são normalmente isoladas de amostras clínicas: *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter aerogenes*, sendo causadores de infecções nosocomiais (GAVINI et al., 1989).

Pseudomonas aeruginosa está entre os três principais agentes de infecção urinária nosocomial, depois de *Escherichia coli* e enterococos. Possuem de 1 a 5 μm de comprimento e 0,5 a 1,0 μm de largura. São encontrados em água, no solo e nas plantas, incluindo frutas e legumes. Devido às suas habilidades de sobrevivência em ambiente aquoso, são particularmente problemáticos nos ambientes hospitalares (GILLIGAN, 1995). A

espécie *P. aeruginosa* é bem estudada como patógeno nosocomial, podendo provocar também pneumonias severas, infecções em feridas e bacteremias (BERT et al., 1998).

O gênero *Acinetobacter* consiste em cocobacilos Gram negativos que têm de 1 a 2,5 µm de tamanho. As espécies do gênero *Acinetobacter* são amplamente distribuídas na natureza e no ambiente hospitalar, constituindo o segundo não fermentador mais comumente isolado (*P. aeruginosa* é o primeiro), sobrevivendo em superfícies úmidas e secas, e podendo estar presentes na pele humana. A espécie mais freqüentemente isolada é o *A. baumannii*, seguida por *A. Iwoffii* e *A. haemolyticus*. As doenças mais comuns são adquiridas nos hospitais e envolvem o trato respiratório, urinário, e feridas, podendo progredir para uma sepse (GRAEVENITZ, 1995).

3.5. Controle de formigas

A dispersão e o aumento das populações das formigas urbanas são facilitados por um conjunto de características, dentre as quais se destacam: a poliginia, populações unicoloniais, migração das colônias, colônias polidômicas, reprodução por fragmentação, pouca estruturação dos ninhos, operárias com tamanho reduzido e acasalamento sem a ocorrência de vôo nupcial (PASSERA, 1994, BUENO e CAMPOS – FARINHA, 1999a).

Métodos convencionais de controle com aplicações de inseticidas em forma de pós ou aerossóis não são recomendáveis, pois as colônias são normalmente encontradas em locais inacessíveis ou de difícil acesso e tendem a migrar quando submetidas a condições desfavoráveis (GREEN et al., 1954).

Colônias de *M. pharaonis* foram controladas com utilização de iscas de piriproxifen em óleo de amendoim, por Vail e Williams (1995). Esta substância é um análogo do hormônio juvenil e reduz a postura de ovos pelas rainhas, diminuindo a produção de cria e o número de operárias devido aos efeitos tóxicos. As concentrações utilizadas foram 0, 25%, 0,5% e 1%, sendo mais efetivas do que as iscas comerciais. O mesmo princípio ativo foi utilizado em tratamentos de perímetro com dois tipos de iscas para controle de *M.*

pharaonis. O número de operárias foi reduzido entre 84,5 % e 94,3% em duas semanas, na isca formulada com 0,25% (VAIL et al., 1996).

Isclas baseadas em água e glicose, contendo 1% de ácido bórico e isclas granulares com hidrametilnona a 0,9% foram utilizadas para controle de colônias de *T. melanocephalum*, *L. humile* e *M. pharaonis*. A exposição contínua às isclas contendo ácido bórico e hidrametilnona causaram reduções de 90% a 60% para operárias e cria em todas as espécies testadas, respectivamente, por três semanas (KLOTZ et al., 1996).

Em biosensaio de campo, isclas granuladas contendo methoprene a 0,5% foram avaliadas contra operárias de *M. pharaonis* em dormitórios de um campus universitário americano. Os resultados indicaram que as isclas utilizadas provocaram mais de 85% de redução após quatro semanas posteriores ao tratamento (YANG-LEE et al., 2003).

Isclas baseadas em água e glicose, contendo 0,02% a 1% de ácido bórico foram avaliadas em laboratório segundo o consumo e eficácia contra a formiga *Solenopsis invicta*. Altas concentrações de ácido bórico (1%) foram consumidas numa taxa menor do que o grupo controle (água e açúcar 10%). Nas grandes colônias expostas continuamente a 4 concentrações de ácido bórico (0,25; 0,5; 0,75 e 1%), operárias e crias foram reduzidas em 90% em seis semanas. Portanto, baixas concentrações de ácido bórico são necessárias para toxicidade retardada e repelência reduzida (KLOTZ et al., 1997).

Um exemplo recente do sucesso da utilização de isclas no controle de formigas da espécie *Solenopsis invicta* foi registrado em fazendas de criação de peixes nos Estados Unidos. A aplicação de isclas contendo o hormônio regulador de crescimento metoprene reduziu a densidade da população estimada em 57%, num período de tratamento de 4 meses (OI et al., 2004).

A toxicidade oral de compostos de boro foi avaliada em laboratório para operárias de *Linepithema humile*, a formiga argentina. As formigas foram alimentadas com água e glicose (25%) contendo 1% de ácido bórico, tetrahidrato disódio octaborato e bórax. O tempo de mortalidade se deu em função da concentração de boro. Houve uma redução do consumo quando a concentração foi superior a 1% (KLOTZ et al., 2000).

Utilizando colônias de formigas argentinas, foram testados também os inseticidas abamectin, ácido bórico, fipronil, hidrametilnona, imidracloprid e thiamethoxam. As concentrações baixas de fipronil e ácido bórico foram as que apresentaram os resultados mais promissores no controle de *L. humile* (HOOPER-BUI e RUST, 2000, RUST et al., 2004).

Colônias de laboratório de *T. melanocephalum* foram utilizadas para a avaliação de iscas de glicose contendo ácido bórico, fipronil, hidrametilnona e diflubenzuron. Fipronil (0,05%) causou 100% de mortalidade em todas as colônias na primeira semana. O ácido bórico (0,5%) causou 100% de mortalidade de rainhas, cria e operárias no final da terceira semana de tratamento. Hidrametilnona (2%) causou o desaparecimento de 83% das colônias ao final da quarta semana de tratamento, porém algumas rainhas continuaram vivas até a nona semana. O tratamento com diflubenzuron (1%) permaneceu similar às colônias do controle (ULLOA-CHACON e JARAMILLO, 2003).

Na preparação de iscas tóxicas eficientes e economicamente viáveis no controle de formigas, é fundamental conhecer a qualidade e a forma de ação dos ingredientes ativos. Este deve ser de ação retardada, degradável quando exposto ao ambiente, não apresentar efeito repelente, agir mesmo em baixas concentrações, ter ação cumulativa por ingestão e apresentar baixa toxicidade aos mamíferos (BUENO e CAMPOS-FARINHA, 1999b; SOEPRONO e RUST, 2004).

No entanto, em ambientes hospitalares ou áreas de preparação de alimentos a completa extinção das formigas é desejável (HEDGES, 1997). Neste caso, inseticidas de ação rápida que previnem a entrada, o forrageamento e o recrutamento poderiam ser mais adequados. Embora a barreira química previna a entrada das formigas, qualquer lacuna pode permitir a infestação, sendo necessária a utilização de tratamentos complementares e mais abrangentes (RUST, 2001).

4. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

1- verificar a presença de bactérias patogênicas no trato digestório de formigas coletadas em ambiente hospitalar, nos ninhos e larvas criadas no laboratório, a fim de avaliar se estas poderiam servir como reservatórios.

2- analisar a existência de uma relação entre o ambiente em que se encontra a formiga e as bactérias presentes externamente no seu corpo e no trato digestório.

3- caracterizar a presença de endobactérias por meio de extração de DNA em formigas provenientes do laboratório.

4- paralelamente, realizar o levantamento e distribuição espacial das espécies de formigas nos Hospitais: Centro de Saúde de São Carlos e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu e testar um modelo de controle das espécies de formigas presentes no Hospital das Clínicas da UNESP – Botucatu.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material

5.1.1. Formigas e larvas

As formigas adultas utilizadas neste trabalho foram provenientes de dois ambientes hospitalares e de colônias mantidas em laboratório. As larvas foram provenientes de ninhos mantidos nos formicários dos laboratórios do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biociências de Rio Claro – UNESP. Foram utilizadas as espécies: *C. atriceps*, *T. melanocephalum*, *M. pharaonis*, *M. floricola* e *P. longicornis*

Também foram realizadas 12 coletas de formigas adultas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu e 12 coletas no Hospital Centro de Saúde de São Carlos, ambas no período de um ano. No Hospital de Botucatu, foram coletadas todas as espécies de formigas presentes

nas iscas e uma amostragem (3 formigas por ponto de coleta) foi utilizada nos ensaios microbiológicos, já no Hospital de São Carlos foi coletado o mesmo número de formigas por ponto amostrado, porém não foram utilizadas iscas.

O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu teve suas atividades iniciadas em 1967, com 48 leitos. Atualmente, sua capacidade é de 474 leitos e 32 leitos na UTI. Conta com um corpo clínico formado por 318 profissionais, além de um quadro de pessoal de enfermagem e apoio, num total de 1813 funcionários. Ocupa uma área de 45.127m² e atendeu em 2001, cerca de 1000 pessoas por dia, efetuando no total 411.776 consultas, 9427 cirurgias e 1.839.917 exames.

O Centro de Saúde de São Carlos foi fundado em 1969, e conta hoje com 65 leitos entre enfermarias e UTI. Tem no seu quadro 120 profissionais e também um corpo clínico de aproximadamente 80 médicos que prestam serviços ao hospital.

5.1.2. Meios de cultura para isolamento e identificação.

Os meios de cultura para isolamento das bactérias foram: caldo BHI (Brain Heart Infusion): meios enriquecidos, ágar Mac-Conkey para isolamento de bastonetes Gram Negativos e ágar mEnterococcus para isolamento de enterococos.

Meios de culturas, testes e kits utilizados para a identificação das bactérias: EPM, MILi e ágar Citrato de Simmons para identificação das enterobactérias, API 20 E (Bio- Mérieux) para identificação final das enterobactérias, API 20 NE (Bio- Mérieux) para identificação das não enterobactérias, teste de PYR, ágar bile-esculina e caldo com 6,5% de Na Cl para identificação de enterococos, plasma de coelho para identificação de *Staphylococcus aureus*. Outros meios de cultura com açúcares e aminoácidos também foram utilizados.

5.1.3. Iscas

As iscas utilizadas durante o trabalho consistiram em tubos plásticos, medindo 20 mm de comprimento e 5 mm de diâmetro, com extremidades livres, contendo uma mistura alimentar atrativa, composta de fígado bovino desidratado, bolo tipo pão-de-ló, mel na proporção 1:1:1 e 1% de óleo de amendoim (BUENO e CAMPOS-FARINHA, 1999b). Para o caso do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu foi adicionado a esta mistura o princípio ativo sulfluramida na concentração de 0,1%, para controle das espécies de formigas. Para as formigas da espécie *P. longicornis* e do gênero *Brachymyrmex*, foi utilizada uma isca líquida contendo açúcar e 1% de ácido bórico. A figura 1 apresenta o tubo plástico contendo a isca sólida e o tubo de vidro contendo isca líquida.

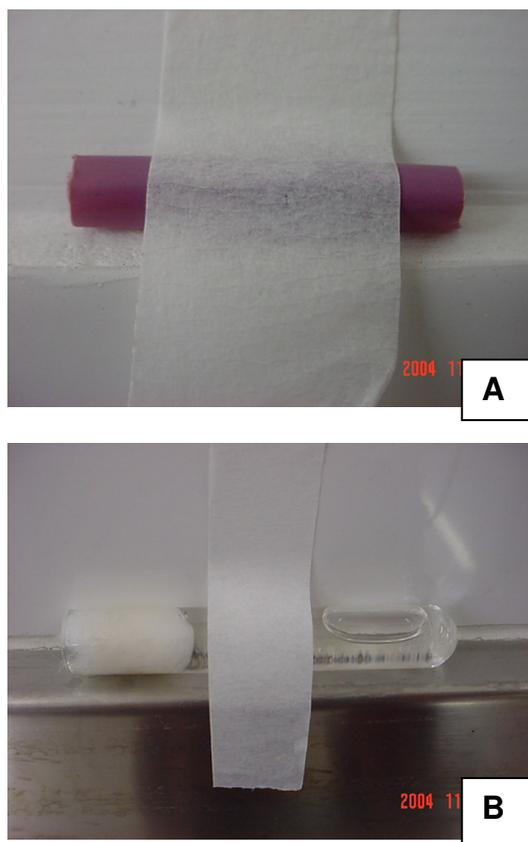


Figura 1: Iscas utilizadas no modelo de controle: A – tubo plástico contendo isca sólida no seu interior, B – tubo de vidro contendo isca líquida.

5.2.Método

5.2.1. Distribuição e identificação das espécies de formigas

No Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu foram utilizadas planilhas de monitoramento contendo informações sobre o ambiente de estudo, descrição da área de cada ponto de coleta e anotações sobre 4 tipos de situações: sem formigas (N), formigas fora da isca (SF), formigas na isca (SI) e tubo vazio (V). Esses dados foram suficientes para estimar o índice de infestação do ambiente e possibilitar montagem de diagramas ao longo do tempo, mostrando a ocupação espacial das várias espécies de formigas e a temporal. No Centro de Saúde de São Carlos não foram utilizadas iscas, as formigas foram coletadas segundo um sistema de procura ativa.

Os exemplares foram coletados e fixados em álcool 80%. Posteriormente, as formigas foram montadas com alfinetes entomológicos e submetidas à

identificação, utilizando chaves pictóricas (BUENO e CAMPOS-FARINHA, 1999a) e quando necessário foram utilizadas chaves completas (BOLTON, 1994).

5.2.2. Coleta de formigas

5.2.2.1. Formigas adultas de Laboratório

As formigas provenientes dos ninhos mantidos em laboratório foram coletadas com o auxílio de pinças de pontas finas, anestesiadas por resfriamento (-4°C), esterilizadas no álcool 70% e posteriormente dissecadas. Para as formigas da espécie *P. longicornis* e *M. pharaonis* uma parte do ninho foi mantida em bandeja e resfriada a -4°C, para as demais espécies os indivíduos eram congelados individualmente.

Após a coleta, as operárias adultas foram dissecadas sob lupa numa câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com luz U.V., e os seus tratos digestórios foram retirados sobre uma zaragatoa estéril, a fim de que não se perdesse conteúdo interno. Após o rompimento do gáster e coleta do conteúdo do trato digestório, as zaragatoas eram introduzidos em tubos contendo BHI e incubados a 36°C. Foram dissecados 100 exemplares para cada espécie das formigas: *C. atriceps*, *T. melanocephalum*, *M. pharaonis*, *M. floricola* e *P. longicornis*. A Figura 2 apresenta a dissecção de operária da espécie *T. melanocephalum* e a Figura 3 apresenta a dissecção de operária da espécie *C. rufipes*.

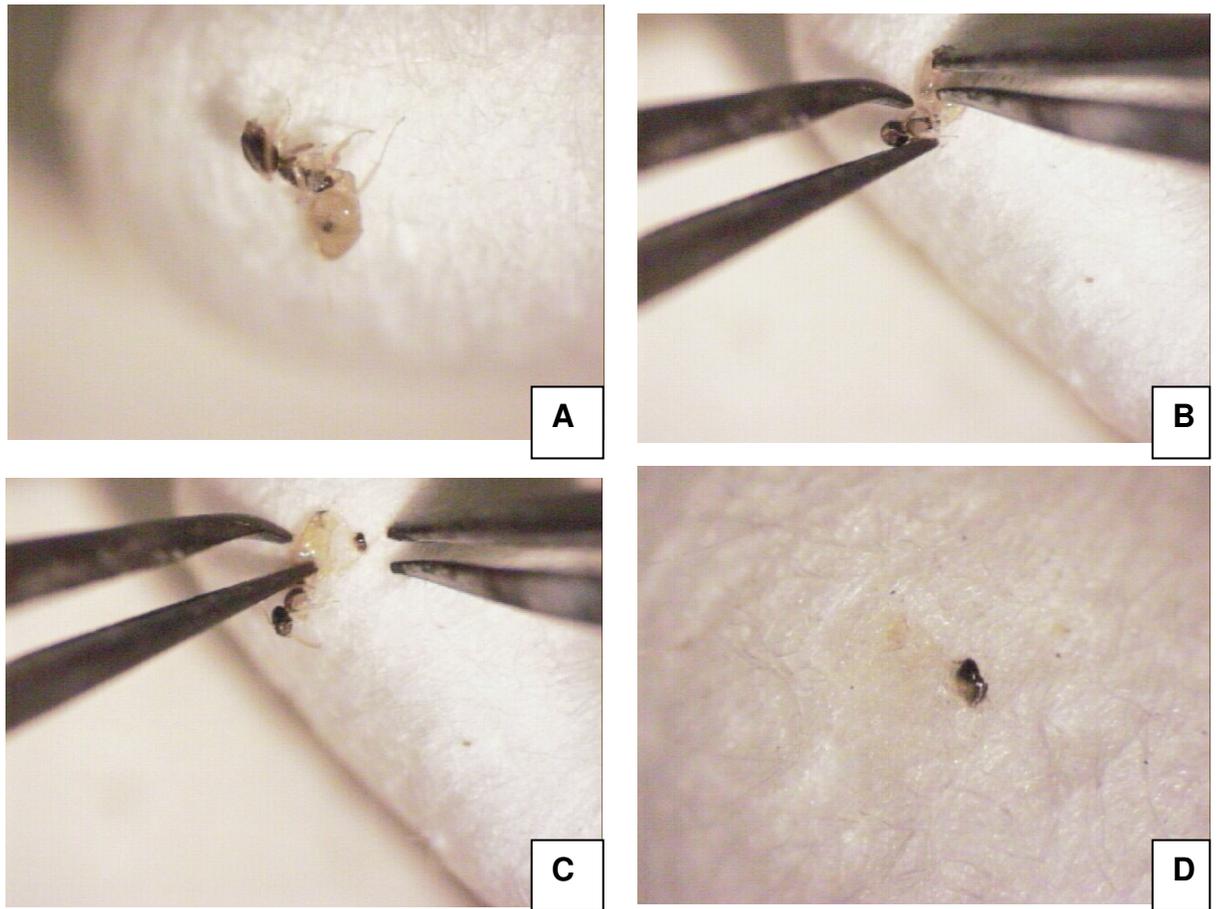


Figura 2: Dissecção de operária da espécie *T. melanocephalum*. A: operária da espécie *T. melanocephalum* sobre zaragatoa; B: Dissecção do gáster da operária; C: rompimento do gáster da formiga com pinça e retirada do conteúdo do trato digestório; D: conteúdo do trato digestório sobre zaragatoa estéril. Aumento 50X.

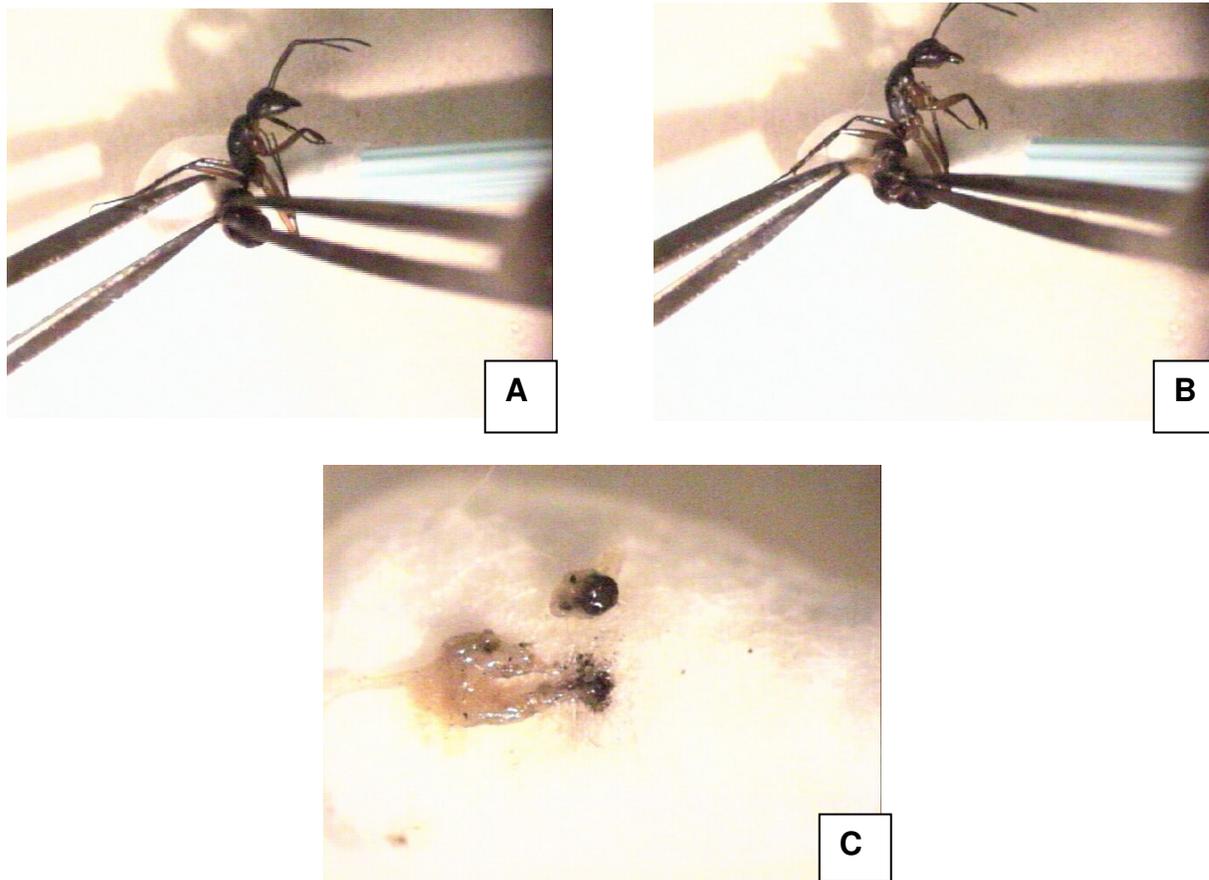


Figura 3: Dissecção de operária da espécie *C. rufipes*. A: operária da espécie *C. atriceps* sendo dissecada com pinças sobre zaragatoa estéril; B: retirada do conteúdo do trato digestório com pinças; C: conteúdo do trato digestório sobre zaragatoa estéril. Aumento 40X.

5.2.2.2. Larvas

Para a análise da presença de bactérias nas larvas, estas foram retiradas dos ninhos no laboratório com auxílio de pinça estéril e foram introduzidas em tubos contendo BHI, para crescimento de bactérias em estufa. Metade das larvas coletadas foi levada para fluxo laminar para que fossem rompidas com pinça estéril no momento em que eram introduzidas no tubo com BHI, a fim de verificarmos as bactérias presentes internamente nas larvas. Foram utilizadas 80 larvas para as espécies *M. floricola* e *M. pharaonis*, sendo que metade delas foi colocada inteira nos tubos e as demais foram rompidas. Para as espécies *T.*

melanocephalum e *C. rufipes* foram utilizadas 20 larvas cada. Para a espécie *P. longicornis* foram analisadas 30 larvas. O número total de larvas utilizadas nestes bioensaios variou de acordo com a disponibilidade das larvas em ninhos do formicário do CEIS-Centro de Estudos de Insetos Sociais, de acordo com a espécie é mais abundante a presença de larvas nos ninhos.

5.2.2.3. Ambiente hospitalar

As coletas nos hospitais foram realizadas tanto através da verificação visual da presença de formigas, com a utilização de iscas atrativas. Foi usado um sistema de monitoramento, onde foram determinados aproximadamente 200 pontos de observação, sendo que 10 % deles estavam localizados na área externa e o restante na área interna. Para o Hospital de São Carlos, proporcionalmente muito menor, foram utilizados aproximadamente $\frac{1}{4}$ dos pontos. Para estimar o índice de infestação foi utilizada uma regra de 3, calculando-se o número total de pontos infestados multiplicado por 100 e dividido pelo número total de pontos existentes no hospital.

A colocação das iscas foi realizada no período da manhã (entre 7 e 9 horas). Após 2 a 4 horas de exposição, elas foram verificadas e anotadas em planilha quanto à presença ou ausência de formigas. Onde houve presença de formigas, foram escolhidos 5 pontos de amostragem para coletas, para que as formigas fossem dissecadas para posterior processamento e isolamento de enterobactérias. Em cada ponto foram coletadas 3 formigas para dissecção em laboratório, totalizando 15 amostras por coleta e 180 ao final do período de 12 meses. Parte delas foi colocada em álcool 80 % para posterior identificação das espécies.

Foram realizadas 12 coletas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu, no período de outubro de 2003 a agosto de 2004, totalizando 2500 pontos de amostragem e 180 amostras de formigas para dissecção.

No Centro de Saúde da São Carlos também foram realizadas 12 coletas, iniciadas em março de 2004, foram amostrados 240 pontos e foram coletadas 180 amostras de formigas para dissecção.

5.2.3. Coleta das formigas utilizadas para amostragem bacteriológica

5.2.3.1. Ambiente

Nas superfícies dos locais onde foram realizadas as coletas de formigas no hospital foram realizados esfregaços com o auxílio de zaragatoa estéril, que foi imediatamente introduzida em um tubo de cultura contendo BHI. Também foram realizados esfregaços com zaragatoa estéril no interior de 10 ninhos das formigas mantidas em laboratório para isolamento das espécies de bactérias presentes. Foram utilizados 10 ninhos de laboratório das espécies *P. longicornis* e *M. floricola*, foram coletadas aleatoriamente 10 formigas de cada ninho e introduzidas em BHI. Na figura 4 encontra-se o tubo com BHI e uma zaragatoa utilizada nas coletas de amostras e na figura 5 algumas das provas bioquímicas utilizadas para Bacilos Gram Negativos.

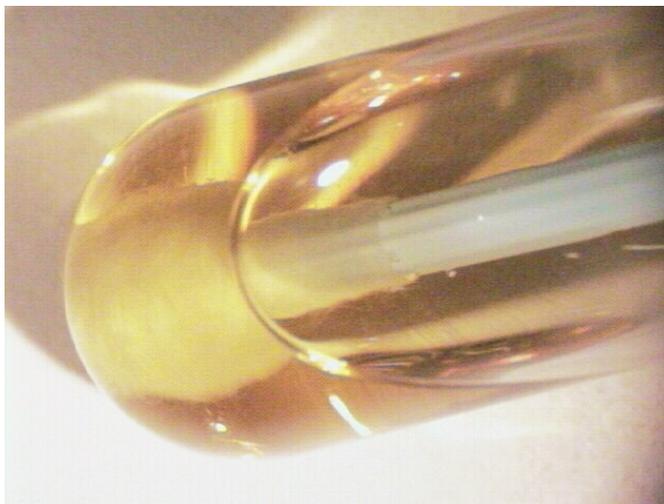


Figura 4: Tubo de ensaio contendo BHI (“Brain Heart Infusion”), meio rico para crescimento de bactérias.



Figura 5: Provas bioquímicas utilizadas para Bacilos Gram Negativos: EPM, Mili, e Citrato de Simons estéreis (esquerda) e após o crescimento de microrganismos (direita), placa de ágar Dnase com crescimento de colônias e formação de halo.

5.2.3.2. Formigas – Análise externa

As formigas encontradas nos diferentes ambientes foram coletadas com o auxílio de pinças de pontas finas estéreis e colocadas em tubos de ensaios esterilizados, para a posterior dissecção. Outros exemplares da mesma espécie foram introduzidos em frascos contendo BHI, para verificar a presença de bactérias sobre seus corpos.

5.2.3.3. Formigas adultas – presença de endobactérias

Para a análise microbiológica das partes internas das formigas, foram coletados 3 exemplares para cada ponto de amostragem, o conteúdo do tubo digestório foi retirado com o rompimento do gáster realizado com pinças estéreis sobre uma zaragatoa previamente esterilizada. A dissecção foi realizada sob lupa no interior de uma câmara de fluxo laminar esterilizada previamente com luz U.V. O conteúdo do trato digestório sorvido pela zaragatoa foi imediatamente introduzida em um tubo de ensaio contendo BHI e incubado a 35°C. Os tubos sem crescimento visível após 48 horas de incubação foram descartados.

Foram realizadas 12 coletas em cada hospital para isolamento de bactérias do trato digestório, do corpo e do ambiente onde se encontrava a formiga. Para cada ponto de coleta dentro do hospital foram dissecados 3 exemplares, totalizando 15 amostras por coleta e 180 ao final do período de 12 meses.

5.2.4. Processamento das amostras

Os tubos de BHI que acusaram presença de bactérias, ou seja, que turvaram após 24 ou 48 horas, foram submetidos à plaqueamento por esgotamento nos meios de cultura ágar - Sangue e ágar MacConkey. As placas semeadas foram incubadas a 35°C por 24 horas. As colônias isoladas foram pré-caracterizadas macroscopicamente pela morfologia colonial, e microscopicamente pela forma, arranjo e reação tintorial das células à coloração de Gram (LENETTE, 1980).

5.2.5. Identificação dos microrganismos.

A metodologia utilizada no isolamento e identificação das bactérias foi aquela descrita por Koneman (1997). As cepas isoladas foram submetidas às provas de identificação clássicas. Embora também possam causar episódios de infecção hospitalar, os Bacilos Gram positivos formadores de esporos foram considerados contaminantes do meio ambiente.

Os cocos Gram positivos foram submetidos à prova da catalase e os cocos que foram catalase positivos foram semeados em meio ágar Dnase e foi realizada a prova de coagulase. Foram considerados *Staphylococcus aureus* as cepas de cocos Gram positivos, catalase, Dnase e coagulase positivos. Os cocos Gram positivos catalase negativos foram semeados em meio ágar mEnterococcus para isolamento de enterococos e foi verificada a capacidade de crescimento em NaCL 6,5% e hidrólise da esculina em presença de bile, para caracterização de enterococos.

Para identificação dos bacilos Gram negativos fermentadores, foram utilizados os meios: 1- EPM, onde se analisou a fermentação da glicose, produção de H₂S, uréase, L-triptofano desaminase e gás à partir da glicose; 2- Mili, onde se estudaram as provas de indol, movimento e utilização de lisina; 3- Citrato de Simmons, onde se pesquisou crescimento ou não neste meio. Vários meios com açúcares e amino-ácidos, além do Kit API-20E (Bio-Mérieux) foram utilizados quando necessários.

Os bacilos Gram negativos não fermentadores de açúcares (aeróbio estritos) seriam submetidos às seguintes provas: crescimento em MacConkey, produção de oxidase, oxidação da glicose, oxidação da maltose, oxidação da lactose, hidrólise da lisina e arginina e liquefação da gelatina, API 20 NE (Bio-Mérieux) para identificação das não enterobactérias e meios com açúcares e aminoácidos também foram utilizados quando necessário.

5.2.6. Caracterização bacteriana dos diferentes ambientes

As bactérias isoladas dos ambientes hospitalares foram comparadas com aquelas bactérias presentes na parte externa do corpo das formigas e no seu trato digestório. Assim, foi obtido um levantamento das espécies de bactérias presentes em cada ambiente estudado: laboratorial (ninhos), hospitalar e exoesqueleto e tratos digestórios. Os dados obtidos foram submetidos a dois tipos de análises:

1º - número efetivo de espécies de bactérias em cada ambiente foi determinado pela fórmula que calcula o número efetivo de espécies (*effective number of species*):

$$ENS = \left(\sum_j^k p_{ik}^2 \right)^{-1}$$

onde p é a proporção de espécies i numa amostra k (FOSTER e FOGLEMAN, 1993).

2º - a sobreposição dos nichos de bactérias foi mensurada pelo índice de Morisita-Horn (KREBS, 1989).

5.2.7. Estudos moleculares das bactérias presentes em *T. melanocephalum*

5.2.7.1. Extração de DNA bacteriano

As formigas foram coletadas diretamente dos ninhos de laboratório e expostas à luz ultra-violeta pelo período de duas horas, com posterior lavagem em álcool 70% e duas imersões em água bidestilada, para completa esterilização da parte externa do corpo (VAN BORM et al., 2002). Em fluxo laminar estéril, dez formigas foram transferidas para “Eppendorff” de 1,5 mL congeladas imediatamente em gelo e trituradas com o auxílio de um pistilo plástico. A extração de DNA utilizada é baseada no método de BENDER et al. (1983) modificado. Os insetos inteiros foram homogeneizados em tampão (100mM Tris, pH 9,1, 100 mM NaCl, 200 mM sacarose, 50 mM de EDTA, 0,5% SDS); o homogenado foi incubado em seguida a 55 °C, por 3 horas; resíduos de proteína foram subsequentemente extraídos com NaCl 5M. A precipitação do DNA foi feita com álcool isopropílico 100% e álcool etílico a 70%. A ressuspensão do DNA foi feita em tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8).

5.2.7.2. Amplificações

As reações de PCR foram efetuadas em ciclador térmico e as condições são adaptadas de VERSALOVIC et al. (1991). As reações foram feitas em tubos apropriados com volume final de 25µL, contendo de 500 a 1000 ng de DNA “template”, 0,2-0,4 µM (5-10 pmol) de cada “primer”; 1,25 mM de cada dNTP, tampão 1x Gitschier (67 mM Tris-HCl, pH 8,8, 16,6 mM β-mercaptoetanol, BSA (160 ng/µL), DMSO 10% e 1 unidade de polimerase

AmpliTaq. Foi utilizado o seguinte ciclo térmico: 5 minutos a 94 °C (denaturação) e 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto e 30 segundos, 44 °C por 1 minuto e 20 segundos e 68 °C por 4 minutos, seguidos por uma extensão final de 65 °C por 10 minutos.

Foram realizadas amplificações das regiões 16S de bactérias onde foram utilizados os iniciadores F27A (AGAGTTTGATCATGGCTCAG) e R1492T (TACGGTTACCTTGTTACGACT) (POLZ e CAVANAUGH, 1998). As extrações e os produtos de amplificação foram verificados através de eletroforese em gel de agarose a 1%.

5.2.7.3. Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados com a utilização do Concert Kit da Life Technologies (cat. 11458-015). Em seguida o DNA foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm.

5.2.7.4. Seqüenciamento

A reação de seqüenciamento conteve cerca de 20 ng de amplicom purificado, 3 pmol de primers F27A e R1492T, e química Big Dye Terminator (PE Applied Biosystems 4303153) e foi conduzida com uma desnaturação inicial (90 seg a 96°C), seguida de 25 ciclos de 12 seg a 96°C, 6 seg a 50°C, 4 min a 60°C. Após a reação, os produtos de extensão foram precipitados com 40 µL de isopropanol 75% e lavados em seguida com etanol 70%. O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático ABI 377.

5.2.7.5. Análise dos resultados

As seqüências obtidas foram comparadas às já depositadas no GenBank, através do aplicativo BLAST. As seqüências geradas e suas

homólogas do GenBank foram alinhadas pelos aplicativos ClustalW (THOMPSON et al.,2004) e o alinhamento foi refinado manualmente.

5.2.8. Controle da infestação de formigas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu.

No Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu foi implantado, paralelamente às coletas para a pesquisa de presença de bactérias, um teste padrão para controle da população de formigas. Foi desenvolvido um sistema de monitoramento multipontual, onde foram determinados aproximadamente 200 pontos de observação, sendo que 10 % deles estavam localizados na área externa e o restante na área interna. Quinzenalmente as iscas eram trocadas, e era avaliada a presença ou ausência de formigas nas iscas dispostas nos pontos de amostragem e foi observada a infestação pelo período de dois anos. Foi possível avaliar a variação dos índices de infestação, bem como a distribuição das espécies de formigas nos setores hospitalares e a eficiência do controle.

6- RESULTADOS

6.1. Coleta e identificação das formigas.

Foram identificadas sete espécies de formigas, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP - Botucatu, no ano de 2003. A Tabela 1 contém uma relação dessas espécies comparativamente aos levantamentos anteriormente realizados no mesmo hospital.

Tabela 1: Ocorrência relativa das espécies de formigas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu nos anos de 1989, 1994 e no levantamento inicial deste estudo, realizado em 2003, SP.

Espécies	Ano		
	Bueno, OC, inf. Pessoal, 1989	Bueno e Fowler, 1994	Cintra, P. 2003
<i>Tapinoma melanocephalum</i>	75,4	2,1	47,6
<i>Paratrechina longicornis</i>	11,4	97,2	49,7
<i>Crematogaster sp</i>	2,2	-	0,2
<i>Pheidole sp</i>	2,2	-	-
<i>Monomorium floricola</i>	2,2	-	1,7
<i>Solenopsis</i>	2,2	-	-
<i>Brachymyrmex sp</i>	1,1	-	5
<i>Camponotus rufipes</i>	1,1	-	0,4
<i>Dorymyrmex sp</i>	1,1	-	0,2
<i>Wasmania auropunctata</i>	1,1	0,7	-
% ocupação inicial	16	73	32
Número de espécies	10	3	7

6.2. Ocorrência de formigas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP – Botucatu.

A Figura 6 apresenta o índice de infestação das formigas presentes no Hospital das Clínicas da UNESP – Botucatu, nos pontos onde foi realizado o controle com iscas.

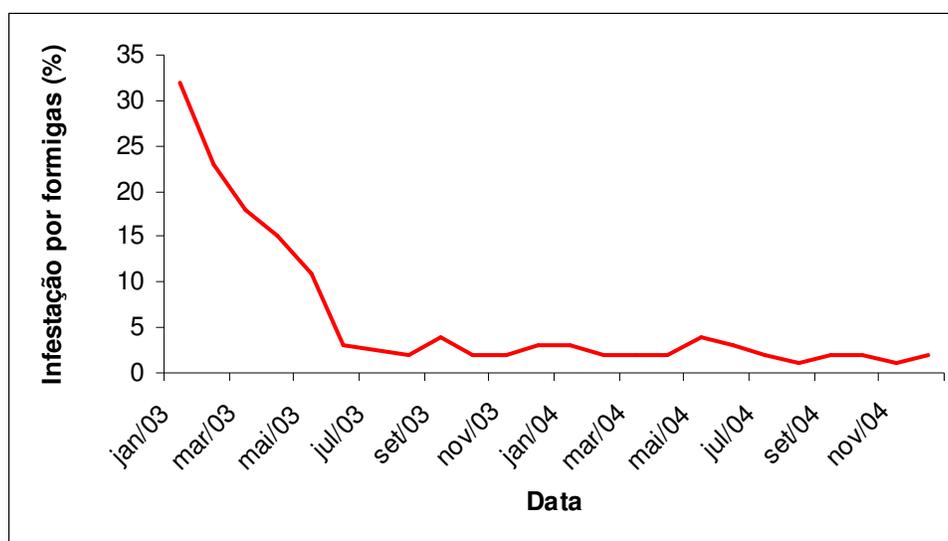


Figura 6: Índice de infestação de formigas nos pontos onde foi realizado controle com iscas, no Hospital das Clínicas da UNESP de Botucatu.

A Figura 7 resume a distribuição temporal das várias espécies por setor do hospital.

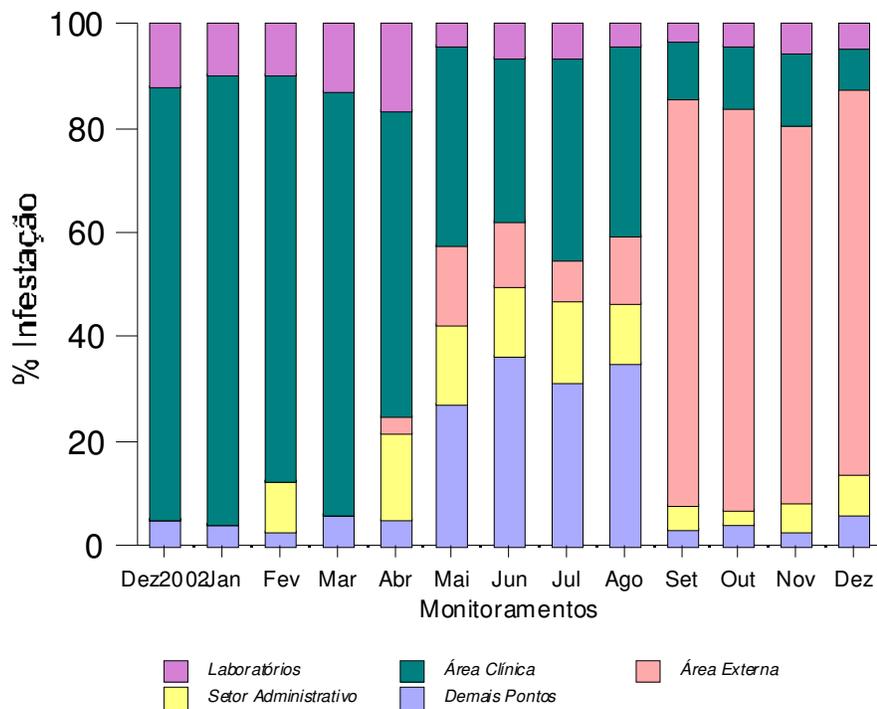


Figura 7: Distribuição relativa de formigas nos setores hospitalares do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu, SP, durante o período de estudo.

A Figura 8 apresenta o índice de infestação relativa das espécies de formigas encontradas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu durante o período de estudo e a Figura 9 apresenta exemplares de formigas predominantes em ambos os ambientes hospitalares estudados.

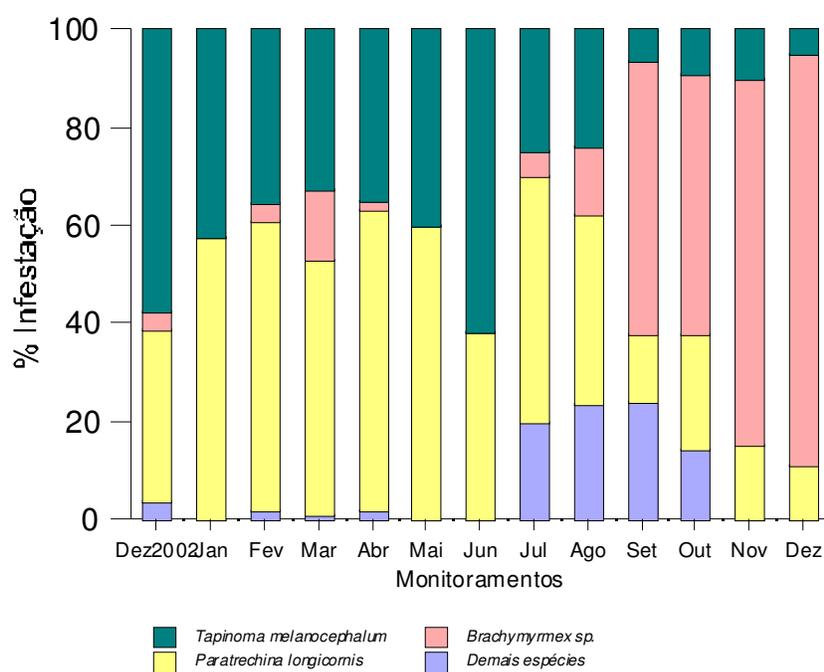


Figura 8: Índice de infestação relativa das espécies de formigas presentes no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu, durante o período de controle, revelando alteração na espécie dominante.

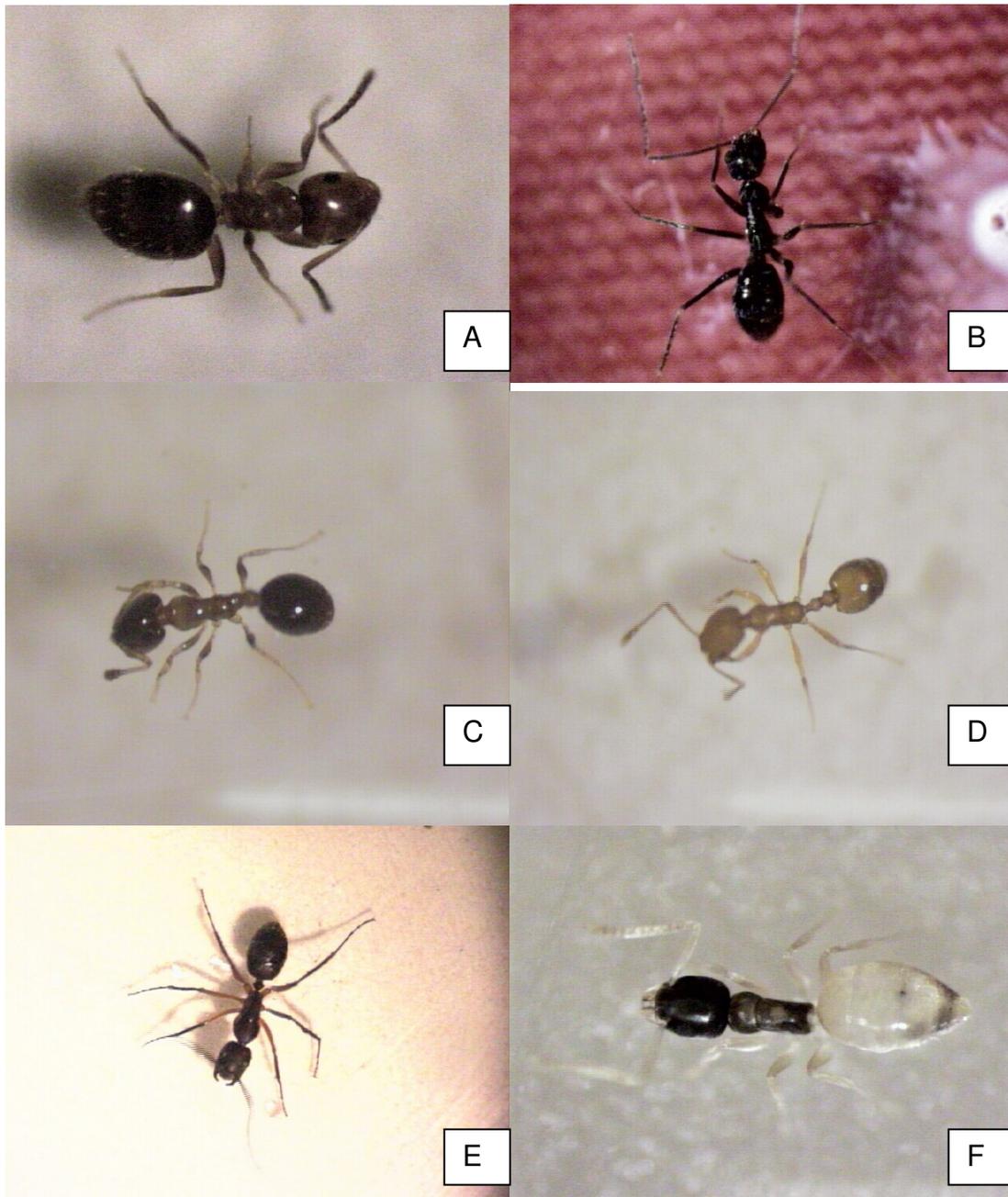


Figura 9: Operárias de formigas predominantemente encontradas nos hospitais estudados. A: *Brachymyrmex* sp.1 (50X), B: *P. longicornis* (40X), C: *M. floricola* (40X), D: *M. pharaonis* (40X), E: *C. rufipes* (6X), F: *T. melanocephalum* (50X).

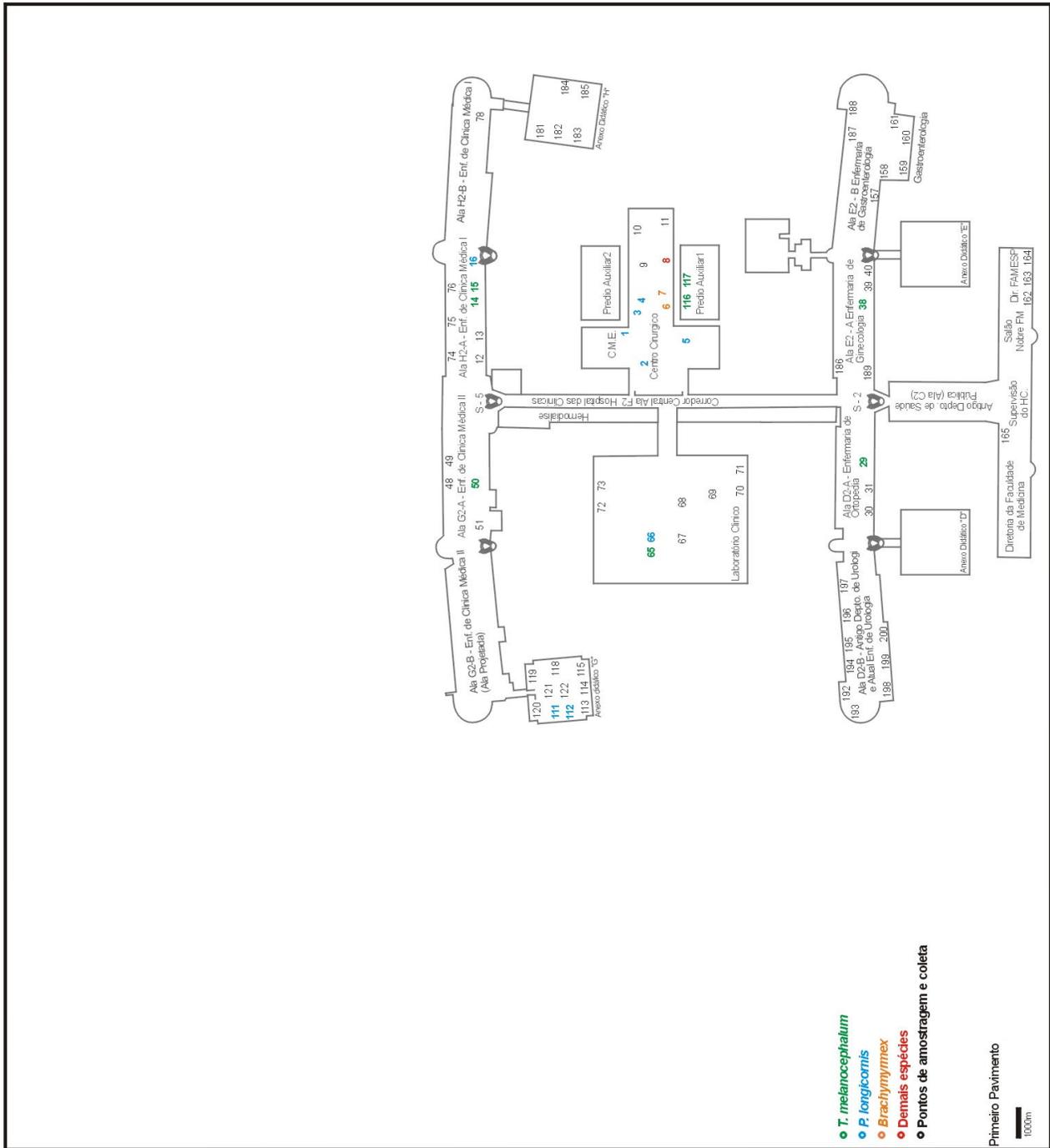


Figura 10 (continuação): Esquema da planta do Primeiro Pavimento do Hospital das Clínicas da UNESP-Botucatu, contendo os pontos de coleta e amostragem e a distribuição das espécies de formigas em outubro/2003.

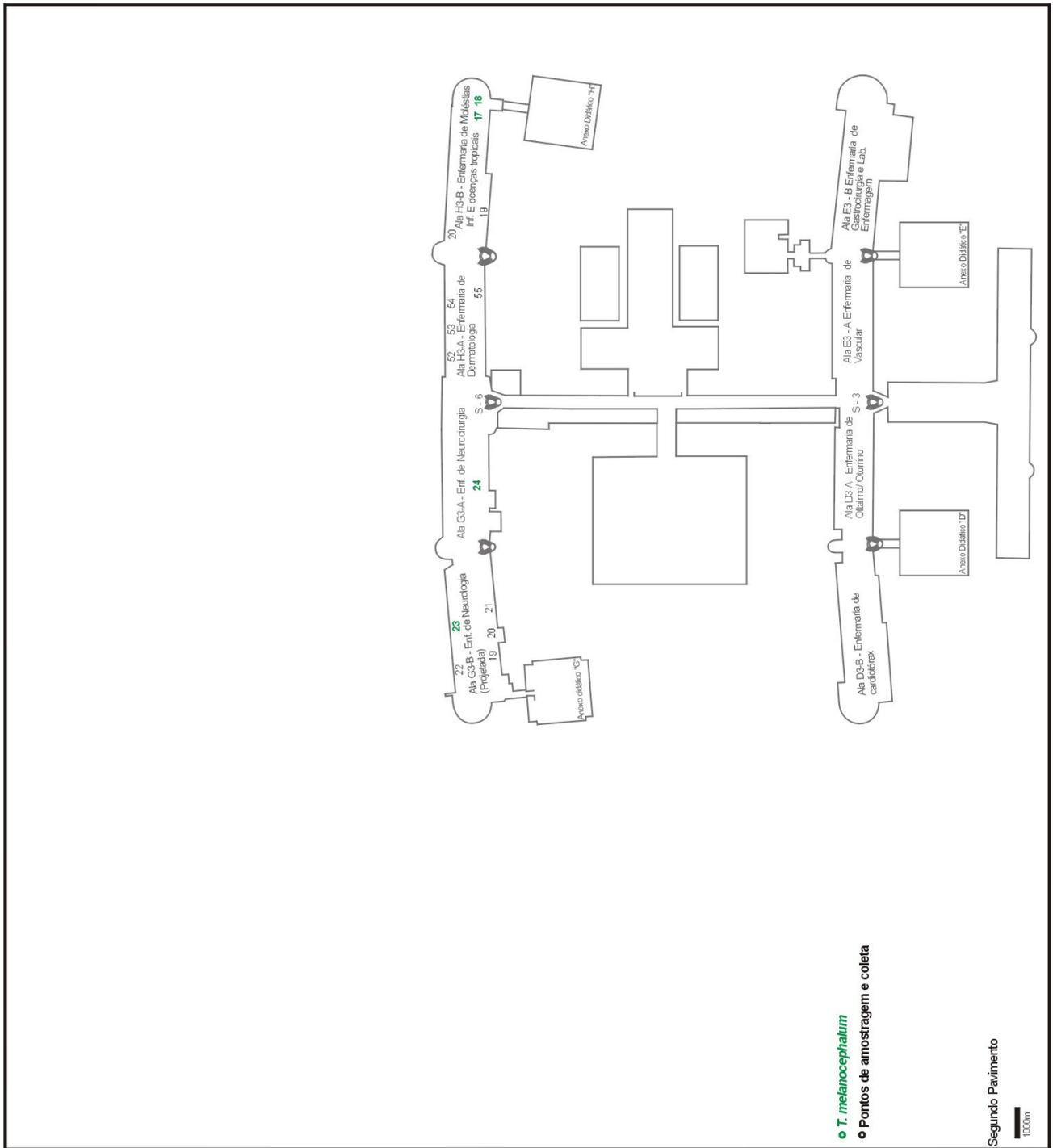


Figura 10 (continuação): Esquema da planta do Segundo Pavimento do Hospital das Clínicas da UNESP-Botucatu, contendo os pontos de coleta e amostragem e a distribuição das espécies de formigas em outubro/2003.

6.3. Bactérias isoladas das formigas e respectivos locais de coleta.

A Tabela 2 resume informações sobre as formigas coletadas e identificadas no Hospital das Clínicas da UNESP-Botucatu, seus respectivos locais de coleta e as bactérias isoladas.

Tabela 2. Formigas coletadas no Hospital das Clínicas da UNESP - Botucatu e bactérias isoladas à partir do trato digestório, corpo e ambiente de coleta.

Data	Ponto de coleta	Setor	Espécie de Formiga	Trato Digestório	Superfície Corporal	Ambiente
out/03						
	35	Triagem	<i>Tapinoma melanocephalum</i>	-	<i>Chryseomonas luteola</i>	-
	80	Hemocentro	<i>Brachymyrmex</i> sp.	-	<i>Enterobacter</i> sp.	BGP
	199	Urologia	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
	209	Tomografia	<i>Brachymyrmex</i> sp.	-	-	-
	216	Litotripsia	<i>Paratrechina longicornis</i>	BGP	BGP	-
nov/03						
	35	Triagem	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	ECN	BGP
	35	Triagem	<i>Tapinoma melanocephalum</i>	-	ECN	ECN
	37	Maternidade	<i>Brachymyrmex</i> sp.	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	ECN
	67	Laboratório	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	-	BGP
	119	Setor administrativo	<i>Brachymyrmex</i> sp.	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
dez/03						
	165	PABX	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	-	BGP
	178	Laboratório	<i>Brachymyrmex</i> sp.	BGP	-	-
	178	Laboratório	<i>Brachymyrmex</i> sp.	-	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter</i> sp.
	199	Urologia	<i>Paratrechina longicornis</i>	BGP	ECN	ECN
	209	Tomografia	<i>Brachymyrmex</i> sp.	-	ECN	ECN
jan/04						
	81	Hemocentro	<i>Brachymyrmex</i> sp.	-	<i>Acinetobacter</i> sp.	BNF
	110	área externa	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	BGP	-
	110	área externa	<i>Brachymyrmex</i> sp.	BGP	-	-
	209	Tomografia	<i>Brachymyrmex</i> sp.	BGP	-	ECN
	216	Litotripsia	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	BGP	-
	219	Litotripsia	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	-	ECN
fev/04						
	35	Triagem	<i>Tapinoma melanocephalum</i>	-	BGP	-
	35	Triagem	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	ECN	-
	198	Urologia	<i>Brachymyrmex</i> sp.	-	-	BGP
	209	Tomografia	<i>Brachymyrmex</i> sp.	-	ECN	-
	217	Litotripsia	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	BNF	-
	220	Setor administrativo	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	BGP	BGP

Tabela 2. Continuação

mar/04						
35	Triagem	<i>Tapinoma melanocephalum</i>	-	-	-	-
168	Laboratório	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	BGP	-	ECN
170	Laboratório	<i>Brachymyrmex</i> sp.	-	ECN	-	-
209	Tomografia	<i>Brachymyrmex</i> sp.	-	-	-	-
abr/04						
142	Laboratório	<i>Brachymyrmex</i> sp.	-	BGP	-	-
227	Setor administrativo	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	BGP	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
268	Quimioterapia	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	-	-	-
270	Rouparia	<i>Brachymyrmex</i> sp.	-	-	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
271	Rouparia	<i>Tapinoma melanocephalum</i>	-	<i>Klebsiela pneumoniae</i>	-	-
mai/04						
35	Triagem	<i>Tapinoma melanocephalum</i>	-	-	-	ECN
jun/04						
35	Triagem	<i>Tapinoma melanocephalum</i>	-	BGP	-	-
36	Maternidade	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	ECN
209	Tomografia	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	-	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
269	Setor administrativo	<i>Brachymyrmex</i> sp.	BGP	BGP	-	-
jul/04						
35	Triagem	<i>Tapinoma melanocephalum</i>	-	-	-	-
36	Maternidade	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	-	-	-
81	Hemocentro	<i>Pheidole</i> sp.	-	-	-	-
209	Tomografia	<i>Brachymyrmex</i> sp.	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
ago/04						
35	Triagem	<i>Brachymyrmex</i> sp.	BGP	BGP	-	BGP
35	Triagem	<i>Tapinoma melanocephalum</i>	-	BGP	-	BGP
80	Hemocentro	<i>Brachymyrmex</i> sp.	BGP	-	-	<i>Enterobacter</i> sp.
209	Tomografia	<i>Brachymyrmex</i> sp.	-	-	-	BNF
269	Setor administrativo	<i>Paratrechina longicornis</i>	ECN	-	-	ECN
set/04						
70	Área externa	<i>Brachymyrmex</i> sp.	-	<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	-
80	Hemocentro	<i>Brachymyrmex</i> sp.	-	-	-	ECN
83	Lactário	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	BGP
209	Tomografia	<i>Brachymyrmex</i> sp.	-	-	-	-
227	Setor administrativo	<i>Brachymyrmex</i> sp.	-	ECN	-	ECN

BGP= Bacilos Gram Positivos, ECN= Estafilococos Coagulase Negativos, BNF= Bacilos Gram Negativos Não Fermentadores

6.4.Ocorrência de formigas no Centro de Saúde de São Carlos.

Foram identificadas quatro espécies de formigas no Centro de Saúde de São Carlos, de acordo com a Tabela 3

Tabela 3: Abundância relativa das espécies de formigas no Centro de Saúde de São Carlos, SP.

Espécies	Ano 2004
<i>Paratrechina longicornis</i>	33,3
<i>Pheidole</i> sp.	6,0
<i>Monomorium floricola</i>	50
<i>Solenopsis</i>	6,3
<i>Camponotus rufipes</i>	6,3
% ocupação inicial	36
Número de espécies	5

Na Figura 11 encontra-se a variação do índice de infestação, calculado pelo período de um ano no Centro de Saúde de São Carlos. A Figura 12 resume a distribuição relativa das várias espécies e na Figura 13 encontram-se as espécies de formigas identificadas e sua porcentagem de infestação. Neste hospital não foi realizado o controle com iscas, somente era realizado um controle convencional realizado por firma comercial contra insetos-praga em geral.

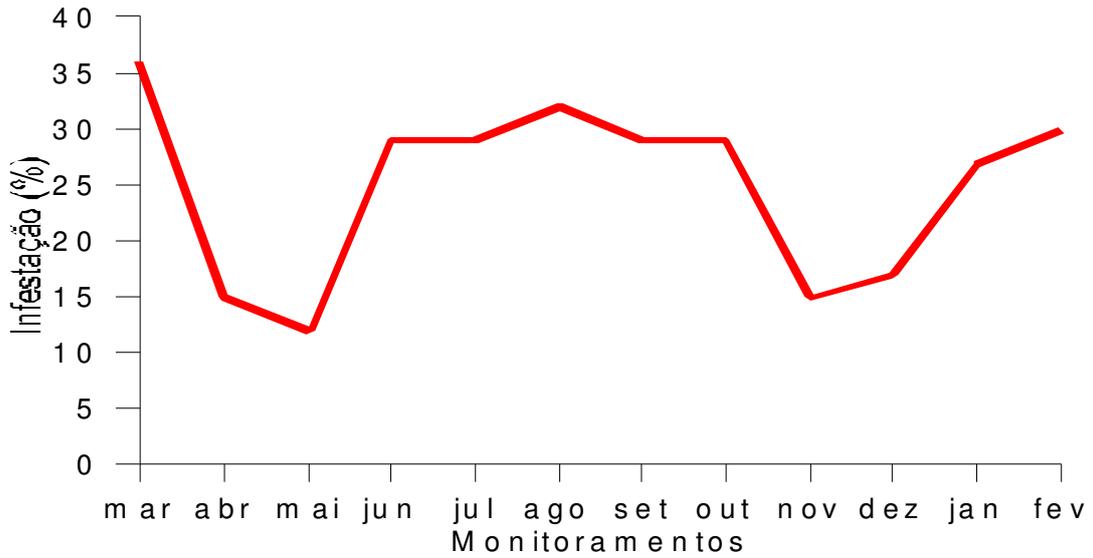


Figura 11: Índice de infestação total de formigas presentes no Centro de Saúde de São Carlos, SP

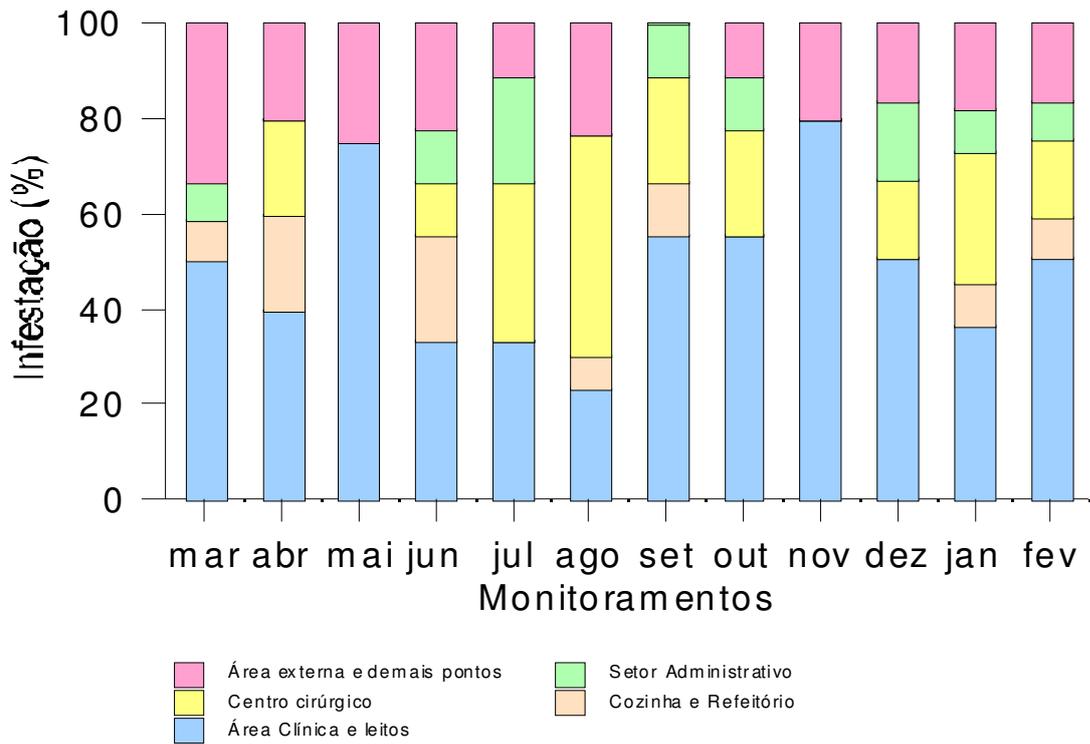


Figura 12: Distribuição relativa das formigas nos setores hospitalares do Centro de Saúde de São Carlos, SP.

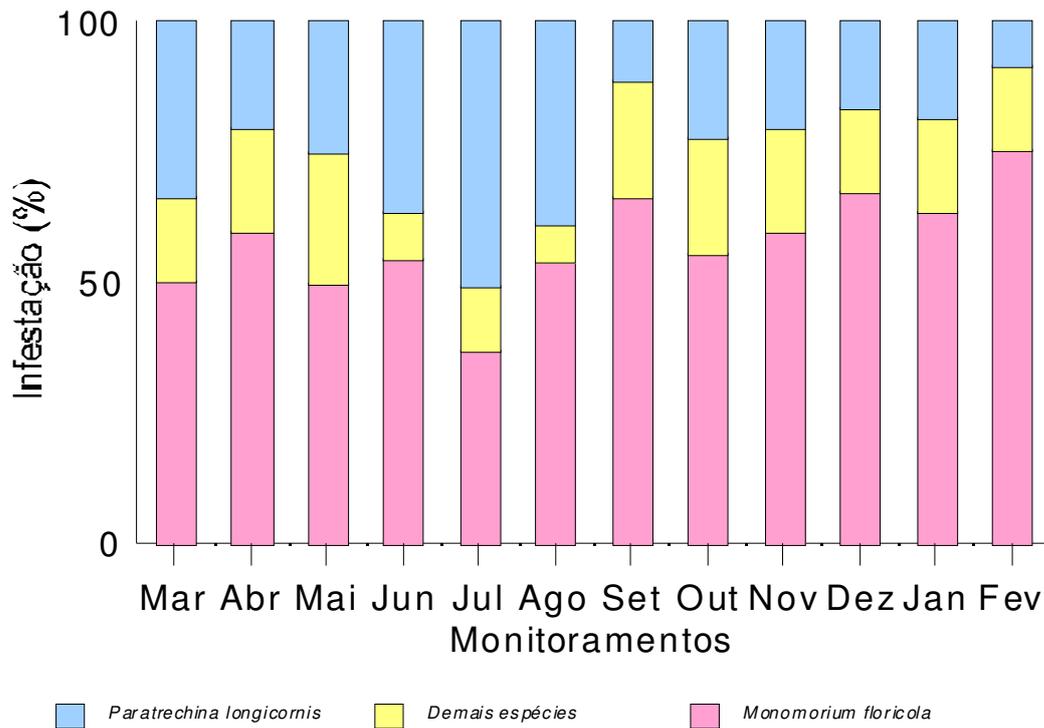


Figura 13: Índice de infestação relativa das espécies de formigas presentes no Centro de Saúde de São Carlos, SP

6.5. Bactérias isoladas das formigas e respectivos locais de coleta.

Na Figura 14 encontram-se a distribuição espacial das formigas no Centro de Saúde de São Carlos e os pontos de amostragem e coleta.



Figura 14: Esquema da planta do Pavimento Térreo do Centro de Saúde de São Carlos, contendo os pontos de coleta e amostragem e a distribuição das espécies de formigas em março/2004.

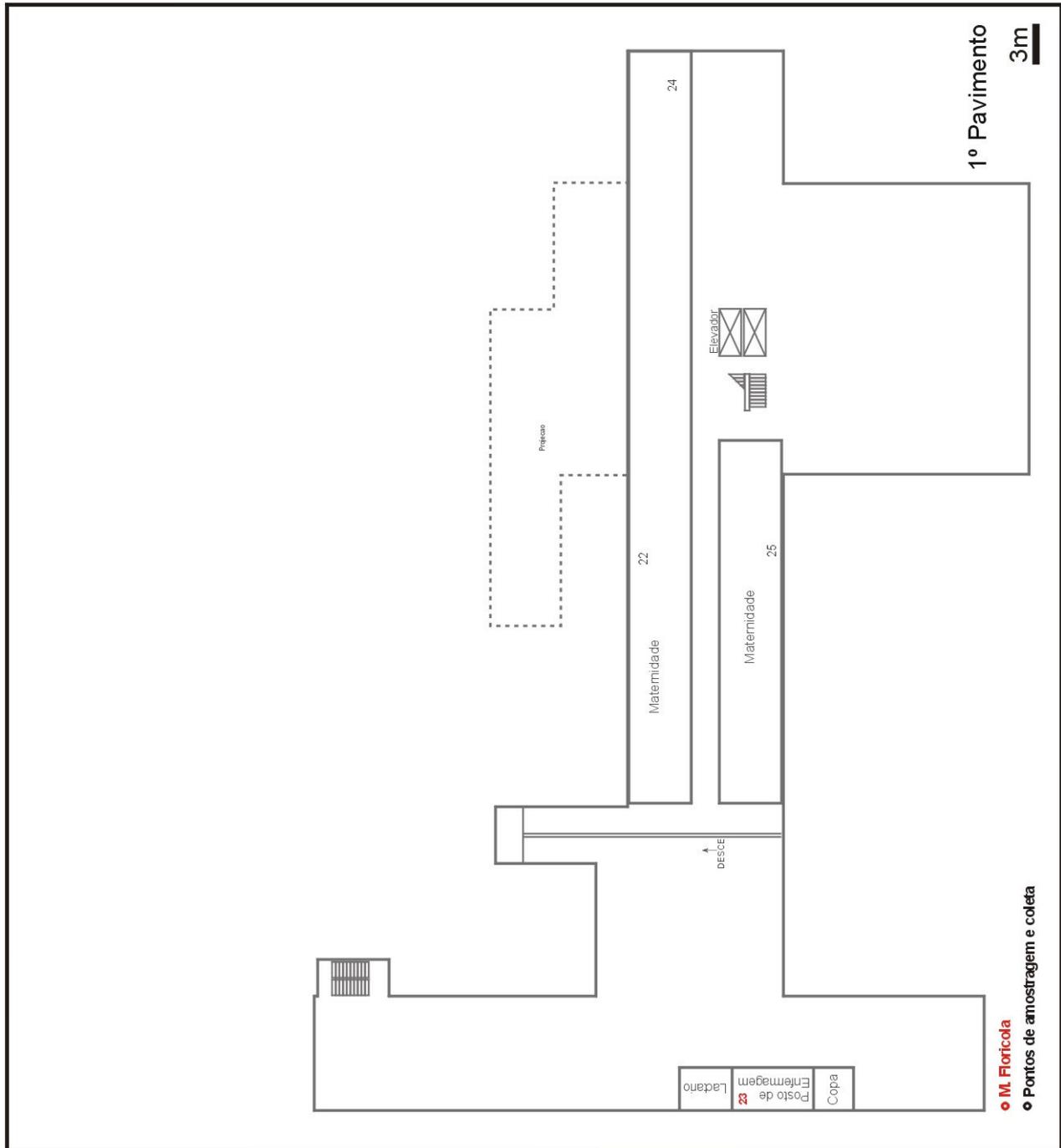


Figura 14 (continuação): Esquema da planta do Primeiro Pavimento do Centro de Saúde de São Carlos, contendo os pontos de coleta e amostragem e a distribuição das espécies de formigas em março/2004.

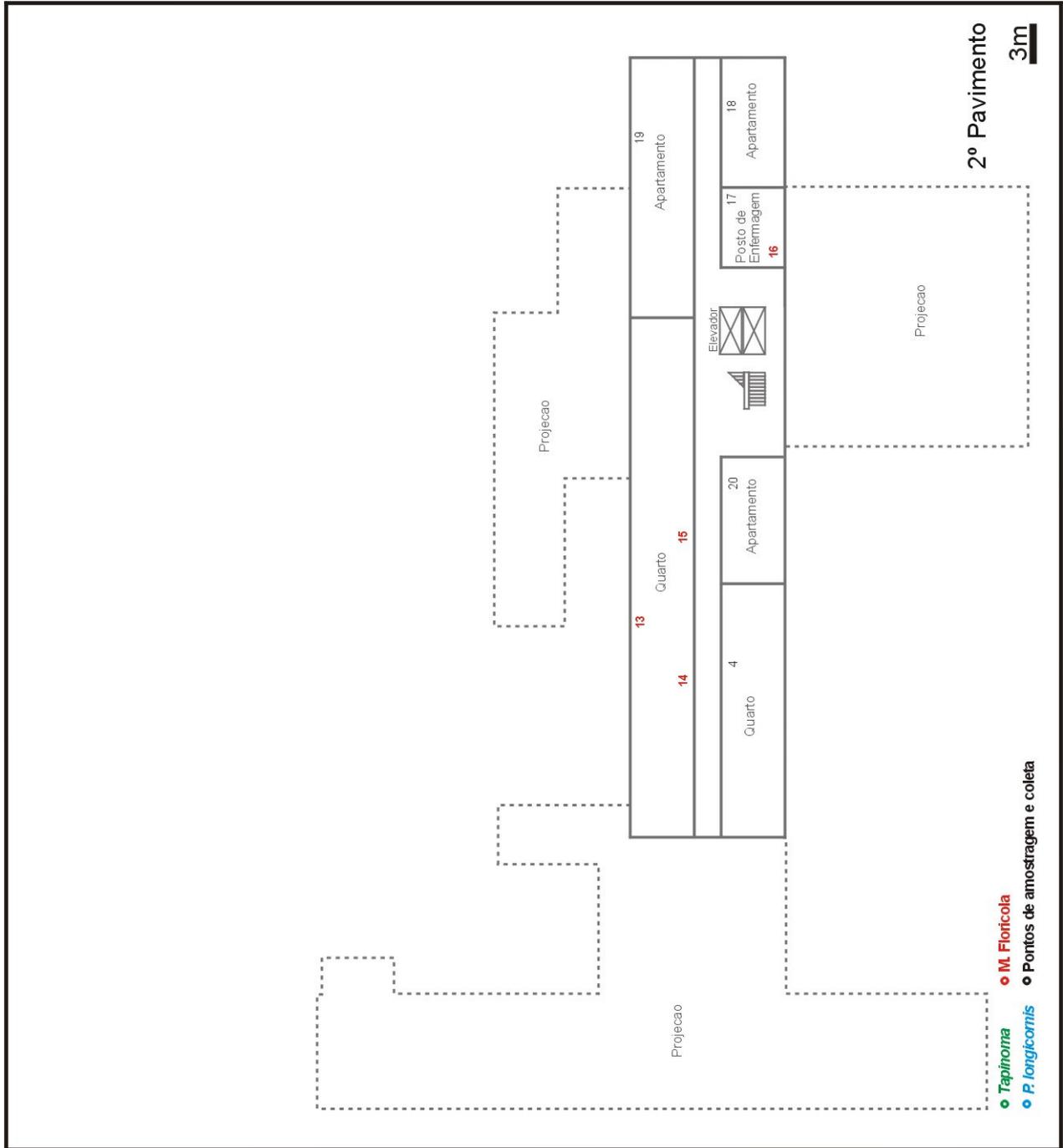


Figura 14 (continuação): Esquema da planta do Segundo Pavimento do Centro de Saúde de São Carlos, contendo os pontos de coleta e amostragem e a distribuição das espécies de formigas em março/2004.

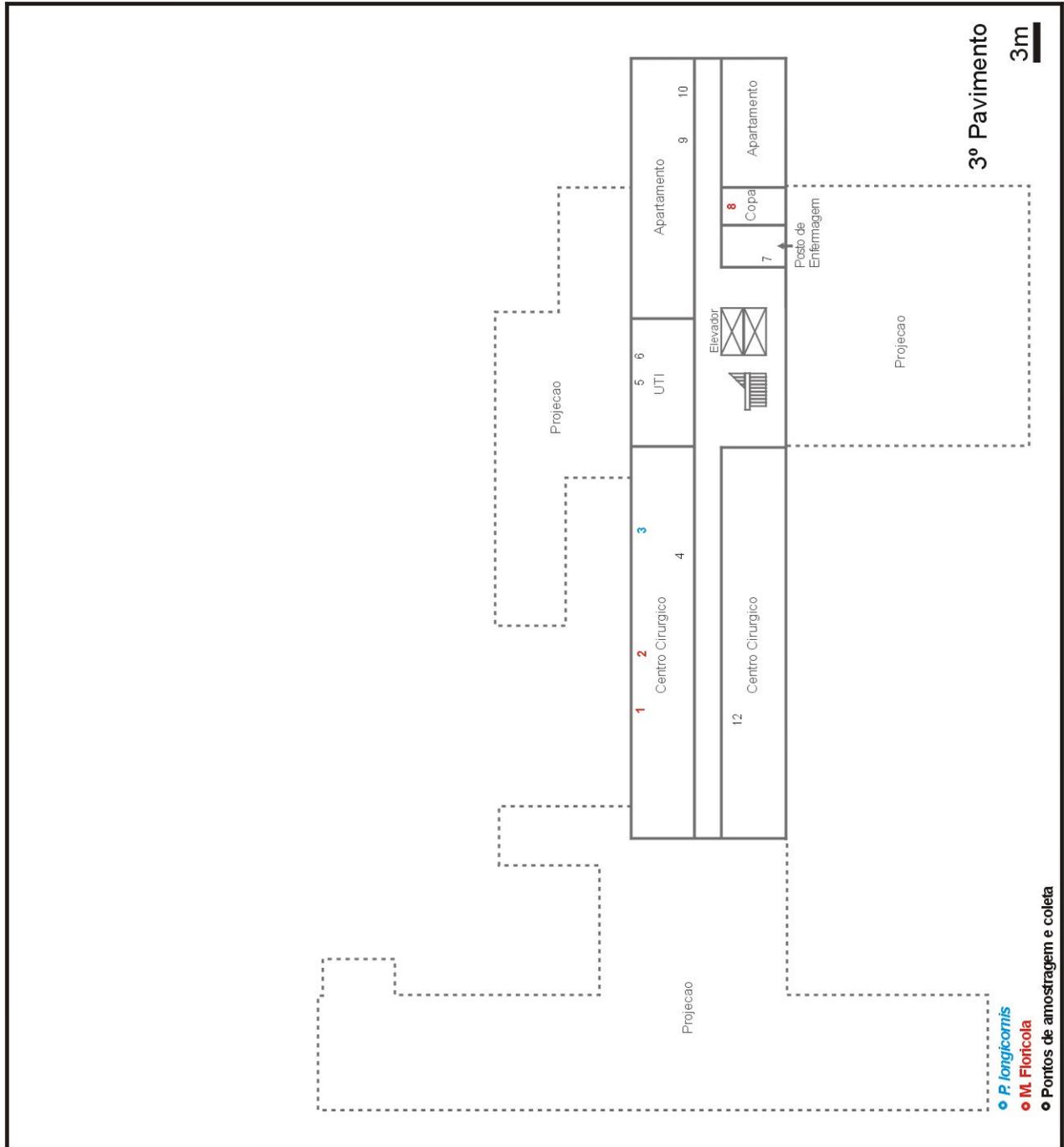


Figura 14 (continuação): Esquema da planta do Terceiro Pavimento do Centro de Saúde de São Carlos, contendo os pontos de coleta e amostragem e a distribuição das espécies de formigas em março/2004.

A Tabela 4 resume informações sobre as formigas coletadas e identificadas no Centro de Saúde de São Carlos, seus respectivos locais de coleta e as bactérias isoladas a partir destas amostras.

Tabela 4. Formigas coladas no Centro de Saúde de São Carlos e bactérias isoladas à partir do trato digestório, corpo e ambiente de coleta.

Data	Ponto de coleta	Setor	Espécie de Formiga	Trato Digestório	Superfície Corporal	Ambiente
mar/04						
	2	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ECN
	3	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	<i>Escherichia coli</i>
	4	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-
	31	Área externa	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	BGP	<i>Escherichia coli</i>
abr/04						
	1	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-
	4	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
	8	Centro cirúrgico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-
	11	Área externa	<i>Pheidole</i> sp.	ECN e <i>S. aureus</i>	BGP	BGP
	32	Cozinha/Refeitório	<i>Paratrechina longicornis</i>	BGP	BGP	-
mai/04						
	6	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-
	31	Área externa	<i>Pheidole</i> sp.	-	-	-
	33	Setor clínico	<i>Paratrechina longicornis</i>	ECN	-	-
jun/04						
	1	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	BGP	-
	2	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-
	6	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	ECN	-	-
	34	Centro cirúrgico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-
	35	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	BNF	ECN
jul/04						
	1	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	2	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	BNF
	34	Centro cirúrgico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	37	Centro cirúrgico	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	BGP	-
	38	Centro cirúrgico	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	BGP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ago/04						
	1	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-
	2	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	ECN	-
	8	Centro cirúrgico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-
	34	Centro cirúrgico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-
	37	Centro cirúrgico	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	-	-

Tabela 4: Continuação

set/04						
1	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-	-
2	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	BGP	BGP	-	-
6	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-	-
27	Farmácia	<i>Tapinoma melanocephalum</i>	-	BNF	-	<i>Enterobacter agglomerans</i>
34	Centro Cirúrgico	<i>Monomorium floricola</i>	-	BGP	-	BGP
out/04						
1	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	BGP
2	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>
6	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-	-
21	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-	BGP
39	Lavanderia	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	-	-	BGP
nov/04						
1	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
2	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-	ECN
6	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-	-
27	Farmácia	<i>Tapinoma melanocephalum</i>	-	-	-	BNF
40	Lavanderia	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	BNF	-	-
dez/04						
1	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	ECN	-	-	-
2	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-	-
9	Cozinha/Refeitório	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-	ECN
27	Farmácia	<i>Tapinoma melanocephalum</i>	-	ECN	-	ECN
34	Centro cirúrgico	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	-	-	-
jan/05						
1	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	BGP	ECN	-	BGP
2	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	BGP	-	-
6	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	BNF	-	-
15	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	ECN	-	-
37	Centro cirúrgico	<i>Paratrechina longicornis</i>	-	-	-	-
fev/05						
6	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-	ECN
9	Cozinha/Refeitório	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-	BNF
21	Setor clínico	<i>Monomorium floricola</i>	BGP	-	-	-
37	Centro cirúrgico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-	<i>Serratia marcescens</i>
38	Centro cirúrgico	<i>Monomorium floricola</i>	-	-	-	<i>Staphylococcus aureus</i>

BGP= Bacilos Gram Positivos, ECN= Estafilococos Coagulase Negativos, BNF= Bacilos Gram Negativos Não Fermentadores

6.6. Bactérias isoladas do trato digestório de formigas de laboratório.

Foram realizados no total de 500 dissecções com formigas provenientes do Formicário do Centro de Estudos de Insetos Sociais. Utilizaram-se 100 exemplares das seguintes espécies de formigas: *T. melanocephalum*, *M. pharaonis*, *M. floricola*, *P. longicornis* e *C. atriceps*, como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5. Frequências das bactérias isoladas do trato digestório de *T. melanocephalum*, *M. pharaonis*, *M. floricola*, *P. longicornis* e *C. atriceps*, em laboratório.

Espécies de bactérias	Número de cepas isoladas					Frequência %
	<i>T. melanocephalum</i>	<i>M. pharaonis</i>	<i>M. floricola</i>	<i>P. longicornis</i>	<i>C. atriceps</i>	
Estafilococos coagulase negativo ECN	4	7	1	-	2	2,8
Bacilo Gram Negativo Não Fermentador BNF	-	-	-	-	1	0,2
Bacilo Gram Positivo BGP	6	4	-	13	18	8,2
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	-	-	-	-	0,2
<i>Enterobacter</i> sp.	1	-	-	-	-	0,2
<i>Citrobacter</i> sp.	1	-	-	-	-	0,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	3	-	-	-	0,8
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	1	-	0,2
<i>Serratia rubidea</i>	-	-	-	1	-	0,2
Total	14	14	1	15	21	13

6.7. Bactérias isoladas dos ninhos de laboratório

Na Tabela 6 encontram-se as bactérias isoladas do ninho e superfície dos corpos das formigas das espécies *M. floricola* e *P. longicornis*.

Tabela 6. Bactérias isoladas das colônias de laboratório e superfície dos corpos de *M. floricola* e *P. longicornis*.

Colônia	Espécies de bactérias isoladas			
	Colônia	Superfície corporal	Colônia	Superfície corporal
	<i>M. floricola</i>		<i>P. longicornis</i>	
1	BGP	-	<i>Citrobacter freundii</i>	ECN
2	BGP	-	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-
3	BGP	ECN	BNF	-
4	BGP	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-
5	BGP	-	BNF	<i>Enterococcus faecalis</i>
6	ECN	ECN	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
7	<i>Escherichia coli</i>	-	BGP	BGP
8	BGP	-	BGP	
9	BGP	-	BNF	-
10	BGP	-	BGP	<i>Enterococcus faecalis</i>

ECN= Estafilococos coagulase negativo

BNF= Bacilo Gram negativo não fermentador

BGP= Bacilo Gram positivo

Tabela 8. Bactérias isoladas a partir de larvas de colônias de laboratório da espécie *M. floricola*

Larva	Espécies de bactérias isoladas						
	Larvas inteiras	Larvas rompidas		Larvas rompidas			
1		21	<i>E. faecalis</i>	41	61	<i>E. faecalis</i>	
2	<i>Bacillus sp.</i>	22	<i>Enterococcus sp.</i>	42	<i>E. faecalis</i>	62	<i>E. faecalis</i>
3		23	<i>E. faecalis</i>	43		63	<i>E. faecalis</i>
4		24	<i>E. faecalis</i>	44		64	<i>E. faecalis</i>
5	<i>Bacillus sp.</i>	25	<i>E. faecalis</i>	45	<i>E. faecalis</i>	65	<i>E. faecalis</i>
6		26	<i>E. faecalis</i>	46		66	<i>E. faecalis</i>
7		27		47		67	<i>E. faecalis</i>
8		28		48		68	<i>E. faecalis</i>
9	<i>Bacillus sp.</i>	29	<i>E. faecalis</i>	49		69	<i>E. faecalis</i>
10		30		50		70	<i>E. faecalis</i>
11		31	<i>E. faecalis</i>	51	<i>E. faecalis</i>	71	
12		32		52		72	
13	<i>Bacillus sp.</i>	33	<i>Enterococcus sp.</i>	53		73	<i>E. faecalis</i>
14		34		54		74	<i>E. faecalis</i>
15		35		55		75	<i>E. faecalis</i>
16		36	<i>E. faecalis</i>	56	<i>E. faecalis</i>	76	
17		37	<i>E. faecalis</i>	57	<i>E. faecalis</i>	77	
18	<i>Bacillus sp.</i>	38	<i>E. faecalis</i>	58	<i>E. faecalis</i>	78	<i>E. faecalis</i>
19		39		59	<i>E. faecalis</i>	79	
20	<i>Bacillus sp.</i>	40		60		80	<i>E. faecalis</i>
Total		6 (30%)		12 (60%)		7 (35%)	15(75%)

6.9. Caracterização bacteriana dos diferentes locais de isolamento

Foram isoladas 249 cepas de bactérias e todas foram caracterizadas bioquimicamente para identificação dos gêneros e da espécie, quando possível. As cepas de bactérias isoladas foram classificadas em 20 grupos diferentes, das quais 14 foram classificadas ao nível de espécie e as demais ao nível de gênero. O gênero *Bacillus* foi o prevalente entre as amostras (39,7%), seguido por Estafilococcus coagulase Negativo (ECN) (20%), *Enterococcus faecalis* (19,2%), Bacilo Gram Negativo não Fermentador (BNF) (6,4%), *Enterobacter cloacae* (3,6%), *Serratia liquefaciens* (2,8%), e *Staphylococcus aureus* (3,2%)

A Tabela 9 apresenta um resumo geral de todas as espécies de bactérias isoladas e seus respectivos locais de isolamento. Foi calculado a partir destes resultados o número efetivo de espécies, que se encontra na Tabela 10.

Tabela 9: Distribuição, número de espécies de bactérias isoladas nas amostras e número efetivo de espécies (ENS).

Bactérias	TD (h.A)	TD (h. B)	SC (h.A)	SC (h. B)	A(h.A)	A (h.B)	M. fl(TD)	M. ph(TD)	P. long(TD)	C. atr(TD)	T. mel(TD)	Larvas	Ninhos	Total
<i>Acinetobacter sp.</i>			2		1									3
Bacilo Gram Positivo BGP	8	4	12	9	8	6		4	13	18	6			88
Bacilo Gram Negativo Não Fermentador			1	4	2	2				1		2	3	16
<i>Citrobacter sp.</i>											1			1
<i>Citrobacter freundii</i>													1	1
<i>Chryseomonas luteola</i>			1											1
Estafilococos Coagulase Negativo ECN	1	4	8	4	12	6	1	7		2	4	1		50
<i>Enterobacter sp.</i>			1			1					1			2
<i>Enterobacter agglomerans</i>						2								2
<i>Enterobacter aerogenes</i>						2							1	3
<i>Enterobacter cloacae</i>			3		5						1			9
<i>Enterococcus faecalis</i>			1						1			46		48
<i>Escherichia coli</i>						2							1	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			1									1		2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			1	1		1								3
<i>Pseudomonas putida</i>						1								1
<i>Serratia marcescens</i>						1								1
<i>Serratia rubidea</i>									1					1
<i>Staphylococcus aureus</i>		2	1					3			1			8
<i>Serratia liquefaciens</i>												7		7
Total	9	10	32	18	28	24	1	14	15	21	14	57	6	249
ENS (<i>Effective number of species</i>)	1,25	2,78	4,49	2,84	3,29	6,26	1	2,64	1,32	1,33	2,64	1,5	2,9	

TD= trato digestório
 SC= superfície corporal
 A= ambiente

hosp. A= Botucatu
 hosp. B= São Carlos
 M.fl= *M. floricola*

M. ph. = *M. pharaonis*
 P. long= *P. longicornis*
 C. atr.= *C. atriceps*

T. mel= *T. melanocephalum*

Tabela 10: Número efetivo de espécies isoladas de acordo com ambiente de isolamento.

Amostras	TD (hosp)	SC (hosp)	A (hosp)	Larvas <i>M. fl.</i>	Larvas <i>M. ph.</i>	Ninhos <i>M. fl.</i>	Ninhos <i>P. long.</i>
ENS	2,10	3,96	4,70	1,50	2,82	1,51	4,16

TD= trato digestório
SC= superfície corporal
A= ambiente

M. ph. = *M. pharaonis*
P. long= *P. longicornis*
M.fl= *M. floricola*

Nas Tabelas 11, 12 e 13 se encontram os resultados obtidos do cálculo do índice de Morisita – Horn, realizado para comparar a sobreposição das espécies de bactérias isoladas de diferentes amostras.

Tabela 11: Índice de Morisita-Horn para sobreposição de nichos do trato digestório, superfície corporal e ambiente nos Hospitais de Botucatu (hosp A) e São Carlos (hosp B).

Amostras	TD hospA	TD hospB	SC hospA	SC hosp B	A hospA	A hospB
TD hosp A	-	0,688	0,705	0,813	0,545	0,521
TD hosp B		-	0,881	0,812	0,861	0,771
SC hosp A			-	0,876	0,895	0,844
SC hosp B				-	0,775	0,787
A hosp A					-	0,797
A hosp B						-

TD= trato digestório
SC= Superfície Corporal
A= ambiente

hosp.A= Botucatu
hosp. B= São Carlos

Tabela 12: Índice de Morisita-Horn para sobreposição de nichos de tratos digestórios de formigas de laboratórios, das espécies *M. floricola*, *M. pharaonis*, *P. longicornis*, *C. atriceps* e *T. melanocephalum*.

	<i>M. floricola</i>	<i>M. pharaonis</i>	<i>P. longicornis</i>	<i>C. atriceps</i>	<i>T. melanocephalum</i>
<i>M. floricola</i>	-	0,726	0	0,109	0,444
<i>M. pharaonis</i>		-	0,435	0,521	0,846
<i>P. longicornis</i>			-	0,987	0,711
<i>C. atriceps</i>				-	0,765
<i>T. melanocephalum</i>					-

Tabela 13: Índice de Morisita –Horn para sobreposição de nichos de amostras de larvas e ninhos das espécies *M. floricola*, *M. pharaonis* e *P. longicornis*.

	Larvas <i>M. floricola</i>	Larvas <i>M. pharaonis</i>	Ninhos <i>M. floricola</i>	Ninhos <i>M. pharaonis</i>
Larvas- <i>M. floricola</i>	-	0,874	0,159	0,097
Larvas- <i>M. pharaonis</i>		-	0,151	0,119
Ninhos - <i>M. floricola</i>			-	0,696
Ninhos- <i>M. pharaonis</i>				-

6.10. Estudos moleculares das bactérias presentes em *T. melanocephalum*

As figuras 15 e 16 apresentam a extração de DNA e a amplificação obtida com o primer 16S, específico para bactérias.

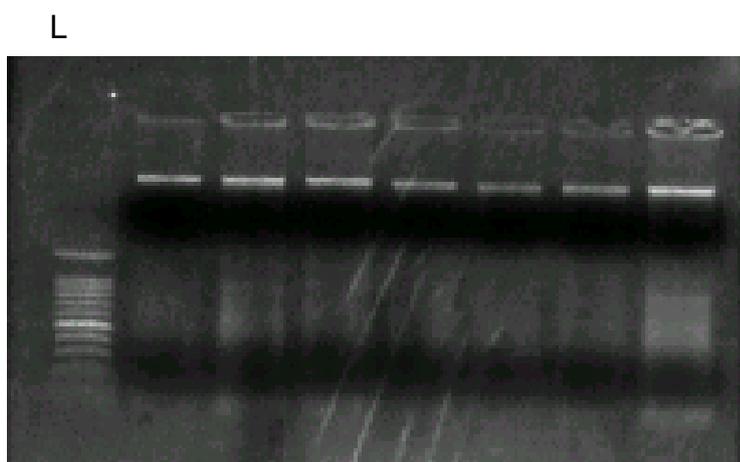


Figura 15: Gel de agarose da extração de DNA de *T. melanocephalum*.

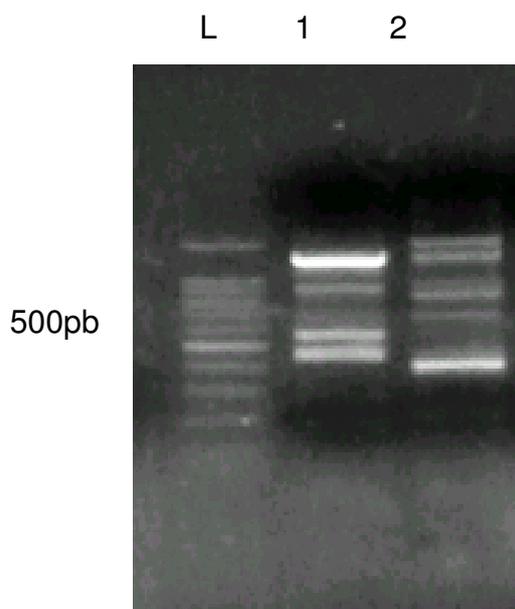


Figura 16: Gel de agarose da amplificação, com primer 16 S.

As figuras 17 e 18 apresentam os alinhamentos de dois segmentos de DNA do gene 16S obtidos com os primers F27A (forward) e R1492T (reverso) de *Wolbachia* sp. , que foram alinhados com *Wolbachia* sp, endobactéria de *Drosophila simulans* (código do GenBank X64265) . *W. pipientis*, endobactéria de *D. simulans* (código AY 833061), e *Wolbachia* sp., endobactéria de *Pulsimulans* sp. (código AY 335934).

```

Alignment: A:\seq word

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5          15          25          35          45          55
1 Pri/F27A -----

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      65          75          85          95          105         115
1 Pri/F27A ----- -TGTGGCAGA CGGGTGAGTA ATGTATAGGA ATCTACCTAG TAGTACGGAA

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      125         135         145         155         165         175
1 Pri/F27A TAATTGTTGG AAACGGCAAC TAATACCGTA TACGCCCTAC GGGGGAAAAA TTTATTGCTA

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      185         195         205         215         225         235
1 Pri/F27A TTAGATGAGC CTATATTAGA TTAGCTAGTT GGTGGAGTAA TAGCCTACCA AGGCAATGAT

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      245         255         265         275         285         295
1 Pri/F27A CTATAGCTGA TCTGAGAGGA TGATCAGCCA CACTGGAACT GAGATACGGT CCAgACTCCT

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      305         315         325         335         345         355
1 Pri/F27A ACGGGAGGCA GCACTGGGgA ATATTGGACA ATGgGCNAAA gCCTGATCCA CCCATGCCGC

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      365         375         385         395
1 Pri/F27A ATGAAGTGAA CAACGNCTTT GGGTTGTAAa cGCTCTTTT

```

Figura 17: alinhamento do segmento de DNA do gene 16S, obtido com o primer F27A (forward) de cerca de 327 pb de *Wolbachia* sp., endosimbionte de *T. melanocephalum*, com segmento correspondente das seqüências obtidas com endobactéria de *Drosophila simulans* (código do GenBank X64265) . *W. pipientis*, endobactéria de *D. simulans* (código AY 833061), e *Wolbachia* sp., endobactéria de *Pulsimulans* sp. (código AY 335934).

Alignment: A:\seq word 2

```

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5          15          25          35          45          55
1ª Pri/R14 GATGAANCGC GAAAAACCTT GCCACtCCTT GACAAtGGAA ATTATACcTA TTCGAAGGGA
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      65          75          85          95          105         115
1ª Pri/R14 TAGGGTCGGT TcGGCAcgGG ATTTCACACA GGGTGTTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      125         135         145         155         165         175
1ª Pri/R14 CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCT CATCCTTAGT TACCATCAGG
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      185         195         205         215         225         235
1ª Pri/R14 tAATGCTGGG GACTTTAAGG AAActGCCAG TGAtAAActG GAGGAAGGTG GGGATGATGT
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      245         255         265         275         285         295
1ª Pri/R14 CAAGTCATCA TGGCCCTTAT GGAGTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGTG GCTACAATGG
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      305         315         325         335         345         355
1ª Pri/R14 GCTGCAAAGT CGCGAGGCTA AGCTAATCCC TTAAAAGCCA TCTCAGTTCG GATTGTACTC
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      365         375         385         395         405         415
1ª Pri/R14 TGCAACTCGA GTGCATGAAG TTGGAATCGC TAGTAATCGT GGATCAGCAC GCCACGGTGA
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      425         435         445         455         465         475
1ª Pri/R14 ATACGTTCTC GGGTCTTGTA CACACTGCCC GTCACGCCAT GGgAATTGGT TtCActGAAG
      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|
      485         495         505         515         525         535
1ª Pri/R14 CAACGNCTAC CGNANCANTG GGAANTTANA CCNTTNGAGT CCNCGNAGAG NNNCG

```

Figura 18: alinhamento do segmento de DNA do gene 16S, obtido com o primer R1492T de cerca de 485 pb de *Wolbachia* sp., endossimbionte de *T. melanocephalum*, com segmento correspondente das seqüências obtidas com endobactéria de *Drosophila simulans* (código do GenBank X64265) . *W. pipientis*, endobactéria de *D. simulans* (código AY 833061), e *Wolbachia* sp., endobactéria de *Pulsimulans* sp. (código AY 335934).

6.11. Controle de Formigas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP – Botucatu

A Figura 19 apresenta os dados obtidos na execução do modelo de controle realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu, pelo período de dois anos. Está representado nesta figura o índice de infestação de formigas em todo o hospital e os índices relativos a cada espécie de formiga.

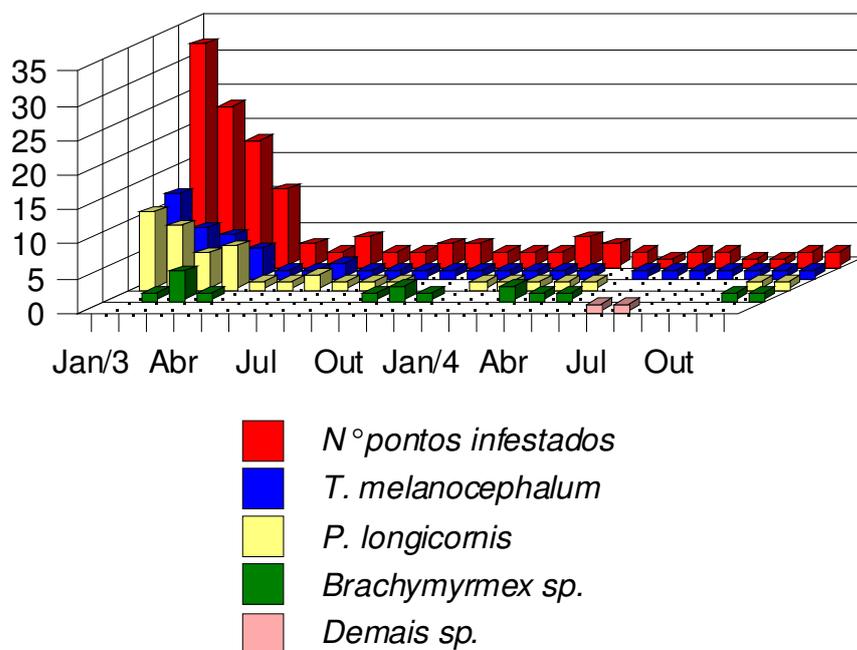


Figura 19: Índice de infestação de formigas presentes no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu, período: jan/2003 a dez/2004.

7 . DISCUSSÃO

Os resultados obtidos permitiram relacionar a alteração de espécies predominantes no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu. Foram identificadas sete espécies de formigas e duas delas infestavam a maioria dos pontos amostrados: *T. melanocephalum* e *P. longicornis*. Ao longo do tempo houve o aumento da porcentagem de infestação de *Brachymyrmex* sp., que atualmente predomina (Tabela 1). As espécies de formiga predominantemente encontradas nos dois hospitais estudados corroboram os resultados obtidos por outros autores como Bueno e Fowler (1994), Delabie et al., (1995), Fontana et al., (1999), Peçanha (2000) e Terossi (2000). Segundo esses trabalhos foram identificadas em média 10 espécies diferentes num hospital. As formigas das espécies *T. melanocephalum*, *P. longicornis*, *M. floricola*, *M. pharaonis*, e algumas espécies dos gêneros *Brachymyrmex* e *Camponotus* estão normalmente entre as mais coletadas nos levantamentos realizados por esses autores. A análise da composição das espécies de formigas em hospitais do Estado de São Paulo, avaliada por Bueno e Fowler (1994) revelou que as espécies *T. melanocephalum* e

M. floricola estavam presentes em todos os 12 hospitais estudados, *P. longicornis* em 9, *M. pharaonis* em 5 e *Pheidole megacephala* em 3 hospitais. *W. auropunctata* foi a espécie nativa encontrada mais consistentemente, aparecendo em 6 hospitais.

No centro de Saúde de São Carlos, a espécie predominante foi *M. floricola*, que representou aproximadamente 50% da infestação. Embora ocorra certa estabilidade na composição das espécies de formigas num curto espaço de tempo, ela pode ser profundamente alterada, levando a uma redução na diversidade e conseqüentemente a uma explosão populacional. Este processo pode ser provocado pelo uso inadequado de inseticidas, ou mesmo pela eliminação de algumas espécies, permitindo a ampliação de uma outra melhor adaptada à convivência com as atividades humanas. Zarzuela et al. (2002) observaram fenômeno semelhante em hospital do interior de São Paulo, a espécie mais abundante também foi *M. floricola*, seguida de *P. longicornis*. Ambas distribuíram-se em vários setores, sendo que onde a densidade de *M. floricola* era maior, não eram encontradas exemplares da espécie *P. longicornis*, embora o contrário não ocorresse.

Os setores clínicos de ambos os Hospitais apresentaram pontos de infestação por formigas, sendo que no Hospital de Botucatu a infestação se concentra atualmente nos pontos externos e demais pontos, que incluem departamentos ou locais que não são parte do setor clínico (Figura 07). Em várias áreas, onde normalmente deve ocorrer maior preocupação com a presença de formigas ou outro tipo de inseto, houve uma grande redução da infestação, para níveis inferiores a 10%, principalmente nas áreas clínicas (Figura 06). No Centro de Saúde de São Carlos a maioria dos pontos infestados está no setor clínico e também no refeitório e centro cirúrgico.

Grande porcentagem das bactérias isoladas das formigas do HC de Botucatu, o foram da parte externa do inseto e apresentaram alto índice de similaridade entre a superfície corporal das formigas e o ambiente no hospital de Botucatu (0,895). O segundo maior índice de similaridade entre os nichos de bactérias foi obtido na comparação entre a superfície corporal das formigas de ambos os hospitais (0,876) (Tabela 11). Culturas dos tratos digestórios não apresentaram praticamente nenhuma bactéria patogênica, somente em alguns casos foram isolados Bacilos Gram Positivos e uma cepa de ECN (ENS= 1,25). Tais

resultados sugerem que as formigas de ambiente hospitalar não são portadoras de tais microrganismos no seu trato digestório, sendo que uma vez identificados podem ser bactérias transientes, não sendo endógenas ao organismo. O maior número efetivo de espécies foi encontrado para o ambiente e superfície corporal das formigas coletadas no hospital de São Carlos (ENS= 4,49 e 6,26) (Tabela 09).

Segundo Dillon e Dillon, (2003) a caracterização da microbiota deve ser idealmente relacionada ao seu papel biológico, porque mesmo se houver grande variação entre a composição e o tamanho da população de bactérias entre insetos individualmente, deve haver estabilidade funcional. O número efetivo de espécies isoladas nos tratos digestórios das formigas coletadas em ambos os hospitais foi baixo (ENS = 1,25 e 2,78), se comparado aos isolados do ambiente e superfície corporal (Tabela 09). Tal resultado sugere que essas bactérias possam ocorrer eventualmente nesses nichos, mas que não estão colonizando os tratos digestórios como as bactérias dos gêneros *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Sphingobacterium*, *Ochrobactrum*, *Myroides*, *Brevundimonas*, *Alcaligenes*, *Stenotrophomonas*, *Moraxella* e *Pseudomonas*, descritas por Jaffé et al. (2001), como colonizantes dos tratos digestório de formigas da espécie *Cephalotes pusillus* (Cephalotini).

No Centro de Saúde de São Carlos, as bactérias isoladas foram principalmente das amostras ambientais e do corpo das formigas. Tais resultados corroboram os obtidos por Fowler et al. (1994). Na segunda coleta realizada foram isoladas uma cepa de *S. aureus* e uma cepa de ECN (Estafilococos Coagulase negativo) do trato digestório de *Pheidole* sp. (Tabela 04). Esta é uma espécie de formiga que não foi coletada repetidamente no Hospital e não foram realizados testes de laboratório para comparação com estes resultados, podendo tratar-se novamente de bactérias transientes, ocorrendo eventualmente no intestino das formigas. Foi isolada nesta mesma coleta outra cepa de *S. aureus* do trato digestório de *M. floricola*. Nas dissecções desta espécie realizadas em laboratório para comparação, não foi isolado nenhum tipo de bactéria patogênica.

Quanto aos resultados laboratoriais, foram isoladas algumas bactérias patogênicas do trato digestório de *P. longicornis* e *T. melanocephalum* (Tabela 05), embora não tenham sido isoladas em nenhum exemplar coletado em ambiente hospitalar. Para as demais espécies dissecadas, também não foram isoladas

bactérias patogênicas. De forma geral o número efetivo de espécies isoladas à partir dos tratos digestórios das formigas de laboratório apresentaram número efetivo de espécies muito baixo (Tabela 09), com exceção de *T. melanocephalum* (ENS= 3,5). Essa é uma das principais espécies de formigas urbanas encontradas em ambiente hospitalar, é muito adaptada a esse local, e passa despercebida devido ao seu reduzido tamanho. Não existem, de maneira geral, trabalhos na literatura que relatem a microbiota existente no trato digestório desses insetos, entretanto, estes não devem ser ambientes estéreis.

O índice de similaridade indicou maior semelhança entre as bactérias isoladas dos tratos digestórios de *T. melanocephalum* e *M. floricola* (0,846). No entanto, o índice entre *M. floricola* e *P. longicornis* foi 0, indicando nenhuma similaridade entre as espécies isoladas dos tratos digestórios dessas espécies.

Os experimentos realizados nos ninhos das formigas *P. longicornis* e *M. floricola* revelaram que o isolamento de bactérias é comum no ambiente laboratorial, estando nos ninhos principalmente nos ninhos da espécie *P. longicornis* (Tabela 06). O número efetivo de espécies encontradas foi alto para os ninhos de *P. longicornis* (ENS= 4,16), embora tenha sido baixo nos tratos digestórios e larvas das formigas dessa espécie. O hábito das formigas regurgitarem o alimento que irá servir de fonte nutritiva para os indivíduos jovens, torna o ninho um ambiente propício ao desenvolvimento das bactérias, pois possui temperatura e umidade ideais (BEATSON, 1972). A maioria das espécies de bactérias patogênicas é amplamente distribuída na natureza, sendo principalmente encontradas na pele, glândulas da pele e membranas mucosas de mamíferos e pássaros, como, por exemplo, as linhagens de *S. aureus* que são coagulase positivas e são bem documentadas como patógenos humanos oportunistas (KLOOS e BANNERMAN, 1995).

Os experimentos realizados com as larvas de formigas das espécies *M. floricola* e *M. pharaonis* revelaram que podem ser encontradas bactérias patogênicas no interior do corpo das larvas (Tabelas 07 e 08). O número efetivo de espécies isoladas foi baixo (ENS= 2,82 para *M. pharaonis*, e ENS= 1,50, para *M. floricola*). No entanto a prevalência das espécies isoladas foi muito alta, variando de 60% a 80% das amostras analisadas. Em ambas as formigas as espécies prevalentes foram *E. faecalis* e *S. liquefasciens*. O mesmo não ocorreu com a

espécie *T. melanocephalum*, onde não foram isoladas bactérias. Não existem na literatura trabalhos que avaliem a presença dessas bactérias em larvas de formigas, assim como elas são comuns no ninho, poderiam colonizar o trato digestório das larvas, que é bem diferenciado do trato digestório dos adultos, sendo um sistema fechado.

Outra característica que deve ser considerada é o fato das operárias adultas filtrarem partículas sólidas durante a sua alimentação, ou seja, ingerem somente líquidos. Um exemplo desse comportamento foi verificado por Petralia e Vinson (1978), ao constatarem que alimentos sólidos oferecidos para as operárias de *Solenopsis invicta* foram utilizados para alimentar as larvas no interior da colônia. As operárias adultas desta espécie possuem filtro na cavidade infrabucal que não permite a passagem de partículas sólidas superiores a 0,88 µm (GLANCEY et al., 1981).

Algumas espécies de bactérias, como *S. aureus* possuem tamanho de 0,5 a 1,5 µm (KLOOS e BANNERMAN, 1995), e a endossimbionte *Wolbachia* possui esse mesmo tamanho em média (TAYLOR et al., 1999). Considerando somente o tamanho das espécies, seria possível a presença de bactérias patogênicas no trato digestório de formigas adultas. No entanto, aparentemente a presença do filtro na cavidade infra-bucal pode limitar a passagem destes microrganismos. O mesmo não acontece com as larvas, e os resultados obtidos sugerem que não ocorre seleção de partículas, sendo que foram encontradas bactérias patogênicas na maioria das larvas examinadas.

Uma vez que não foi isolado um número efetivo de espécies de bactérias significativo entre as formigas adultas, foram utilizadas outras metodologias para analisar a presença de bactérias em seus tratos digestórios. Para tanto, a formiga escolhida foi *T. melanocephalum*, por apresentar o maior número efetivo de espécies isoladas (ENS= 3,5), embora esse número represente apenas 14% do crescimento das amostras.

Utilizando-se de ferramentas de biologia molecular, foi possível o seqüenciamento da bactéria do gênero *Wolbachia*, um endossimbionte amplamente distribuído entre os insetos e os artrópodes em geral. A *Wolbachia* já foi encontrada em mais de 90 espécies de formigas (WHENSELEERS et al., 1998, JEYAPRAKASH e HOY, 2000), incluindo algumas espécies classificadas como

pragas urbanas, como *P. longicornis*, *M. floricola*, *M. pharaonis*, *Linepithema humile* e *T. melanocephalum*.

Em estudos realizados especificamente com a espécie *Linepithema humile*, foi verificada a existência de linhagens distintas dessas bactérias, o que poderia supor especialização para formigas de diferentes regiões (TSUTSUI, et al., 1993). Seriam necessários novos seqüenciamentos de fragmentos maiores isolados de formigas de diferentes locais para estabelecer se poderia estar ocorrendo o mesmo tipo de especiação entre as linhagens de *Wolbachia*. Em comparação, Whenseleers et al, 2002, sugerem que a presença de *Wolbachia* poderia limitar o sucesso das formigas invasoras, uma vez que não foi encontrada em *L. humile*, *S. invicta* e *S. richteri*.

A presença de *Wolbachia* em *T. melanocephalum* não pode ser ainda associada com nenhum tipo de função biológica ou simbiote, segundo dados disponíveis na literatura. Porém, sua detecção não está aparentemente limitando o desenvolvimento e proliferação da formiga nos ambientes hospitalares estudados e nos ambientes urbanos no Brasil, sendo uma espécie comumente encontrada (BUENO e FOWLER, 1994).

O modelo de controle proposto e realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu foi satisfatório, reduzindo para 20% o número de pontos infestados por formigas nas áreas consideradas críticas. Não existem trabalhos na literatura que tratem do controle de formigas dentro do ambiente hospitalar, que é um local de grande circulação de pessoas, onde não pode ser utilizado nenhum tipo de desinsetização convencional, com exceção das iscas em gel. No entanto, devido à grande necessidade da manutenção da higiene, os ambientes são lavados constantemente, reduzindo o tempo de exposição das iscas e induzindo o processo de fragmentação das colônias dentro do hospital.

São fatores importantes no sucesso do controle com utilização de iscas, a disposição em vários locais e a constante renovação das iscas, levando em conta também a preferência alimentar das espécies consideradas.

A diferença entre o controle proposto neste trabalho e a metodologia normalmente adotada por firmas especializadas em controle de insetos está na disposição das iscas e no sistema de monitoramento multipontual. Com utilização de diversos pontos amostrais foi possível monitorar as espécies presentes e

calcular os índices de infestação, que foram sendo reduzidos com o passar do tempo. Outra vantagem do sistema de iscas é a baixa toxicidade e perigo de contaminação, tratando-se de ambiente hospitalar não pode ser considerada a hipótese de utilização de inseticidas do tipo spray, ou similares. Da mesma forma, as formas de controle convencional já provaram ser ineficientes e ambientes urbanos devido às características peculiares das espécies andarilhas (BUENO e CAMPOS- FARINHA, 1999).

8. Conclusões

As formigas presentes em hospitais não apresentaram bactérias patogênicas no seu trato digestório, sendo que estas podem ocorrer eventualmente, e também não funcionam como reservatórios de bactérias.

As bactérias patogênicas podem ser encontradas nos ninhos de formigas de laboratório e nas larvas das espécies *M. floricola*, e *M. pharaonis*, sendo prevalente a espécie *E. faecalis*. As bactérias patogênicas estão presentes nos ambientes hospitalares e na superfície corporal das formigas, como anteriormente demonstrado por outros autores.

A espécie *T. melanocephalum* apresenta o endosimbionte *Wolbachia* sp., porém, a metodologia utilizada buscava o seqüenciamento do DNA de espécies patogênicas, que não estão presentes segundo esses resultados.

O modelo de controle realizado com sistema multipontual e iscas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu reduziram significativamente a infestação por formigas, sendo um método eficiente para utilização em outros hospitais.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEKSEEV, A. N.; BIBIOVKA, V. A.; BRINKMAN, T. ; KANTARBAEVA, K. The persistence of viable plague microbes on the epidermis and in the alimentary tract of *Monomorium pharaonis* in experimental conditions. **Medical Parasitology**, n. 41, p. 237-9, 1972.

BA, A. S.; PHILLIPS, S. A. Yeast biota of red imported fire ant. **Mycological Research** ,n. 100, v. 6, p. 740-746, 1996.

BEATSON, S. H. Pharaoh's ants as pathogens vectors in hospitals. **The Lancet**, v. 1, n.19, p. 425-7, 1972.

BENDER, W.; SPIERER, P.; HOGNESS, D. Chromosome walking and jumping to isolate DNA from the Ace and Rosy loci and the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Molecular Biology**, v. 168, p. 17-33, 1983.

BERNDT, K. P.; EICHELER, W. Die Pharaoameise, *Monomorium pharaonis* (L.) (Hym., Myrmicinae) **Mitteilungerr aus dem Zoologischen Museum in Berlin**, Berlin, v. 63, n. 1, p. 3-186, 1987.

BERT, F.; MAUBAC, E.; BRUNEAU, B.; BERRY, P.; LAMBERT-ZECHOVSKY, N. Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with contaminated tap water in a neurosurgery intensive care unit. **Journal of Hospitalar Infection**, v. 39, n. 1, p. 53-62, 1998.

BERTHELOT, P.; GRATTARD, F.; AMERGER, C.; FRERY, M. C.; LUCHT, F. POZZETO; B. FARGIER, P. Investigation of a nosocomial Outbreak due to *Serratia marcescens* in a maternity Hospital. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 20, n. 4, p. 233-6, 1999.

BIANCALANA, M.L.N.; BORTOLETTO, M. L. Enterobactérias. In: RODRIGUES, E. A. C., MENDONÇA, J. S., AMARANTE, J. M. B., ALVES FILHO, M. B. GRINBAUM, R. S. RICHTMANN, R. **Infecções hospitalares: prevenção e controle**. São Paulo: Sarvier, 1997 p. 609-624.

BILLEN, J.; BUSCHINGER, A. Morphology and ultrastructure of a specialized bacterial pouch in the digestive tract of *Tetraponera* ants (Formicidae, Pseudomyrmecinae). **Arthropod Structure e Development**, v. 3, n. 29, p. 259-266, 2000.

BLOCHMANN, F. Über das Vorkommen Bakterienähnlicher Gebilde in den Geweben und Eiern verschiedener Insekten, **Zbl. Bakt.**, Alemanha, p. 234-40, 1892.

BOLTON, B. **Identification Guide to the ant genera of the world**. Harvard University Press, 1994, 222 p.

BROWER, J. H. Suppression of laboratory populations of *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) by release of males with cytoplasmatic incompatibility. **Jounal of Stored Products Research**, n.15, p.1-4, 1979.

BUCHNER, P. Endosymbionts of Animals with plant microorganisms. New York: **Interscience**, 1965.

BUENO O. C., FOWLER, H. G. Exotic ants and native ant fauna of Brazilian Hospitals. In: **Exotic ants**: biology, impact and control of introduced species. WILLIAMS, D. F. (Ed). Boulder, 1994, p. 191-198.

BUENO O. C.; CAMPOS- FARINHA A. E. C. Formigas urbanas : comportamento das espécies que invadem as cidades brasileiras. **Vetores & Pragas**, São Paulo, ano I, n. 2, p. 13-16, 1998.

BUENO O. C.; CAMPOS- FARINHA A. E. C. As formigas domésticas. In: MARICONI, F. A. M. (Coord.) **Insetos e outros invasores de residências**. Piracicaba: FEALQ, 1999a, cap. 6, p. 135-80.

BUENO O. C.; CAMPOS- FARINHA A. E. C. Estratégias de controle. **Vetores & Pragas**, São Paulo, ano II, n. 5, p. 5-7, 1999b.

CAETANO, F. H.; CRUZ- LANDIM, C. Presence of microorganisms in the alimentary canal of ants of the Tribe *Cephalotini* (Myrmicinae): location and relationship with intestinal structures . **Naturalia**, São Paulo, v. 10, p. 37-47, 1985.

CAMPOS –FARINHA, A. E. C.; JUSTI, Jr. J.; BERGMAN, E. C.; ZORZENON, F. J.; NETTO, S. M. R. Formigas urbanas. **Boletim Técnico – Instituto Biológico, São Paulo**, n. 8, p. 1-20, 1997.

CHADEE, D. D.; MAITRE, A. Ants: potencial mechanical vectors of hospital infections in Trinidad. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.**, London, v. 84, n. 2, p. 297, 1990.

CHEN, J. S. C.; NONACS, P. Nestmate recognition and intraspecific aggression based on environmental cues in Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). **Annals of the Entomological Society of America**, 6,n.93, p. 1333 –1337, 2000.

CORSARO, D; VENDITI, D; PADULA, M.; VALASSINA M. Intracellular life, **Critical Reviews in Microbiology**, n. 25, p. 36-79, 1999.

DASH, D. A.; WEISS, E.; CHANG, K.P. Endosymbionts of insects. In: HOLT, J. C., KRIEG, N. R. (Ed.), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, Baltimore: Williams and Wilkins, 1984, p. 811.

DELABIE, J. H. C.; NASCIMENTO, I. C.; PACHECO, P.; CASIMIRO, A. B. Community structure of house-infesting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Southern Bahia, Brasil. **Florida Entomologist**, v.2, n.78, p. 264-270, 1995.

DILLON, R.J.; DILLON, V. M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. **Annual Review of Entomology**, n. 49, p. 71-92, 2003.

DOBSON, S. L.; TANOUYE, M. Evidence for a genomic imprinting sex determination mechanism in *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Chalcidoidea) . **Genetics**, v. 149, p. 233-242, 1998.

DOUGLAS, A. E. Mycetocyte symbiosis in insects, **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, n. 64, p. 409-34, 1989.

EDWARDS, J. P.; BAKER, L. F. Distribution and importance of the Pharaoh's ant *Monomorium pharaonis* (L) in national Health Service Hospitals in England. **Journal of Hospital Infection**, n. 2, p. 249-54, 1981.

EICHELER, W. Health aspects and control of *Monomorium pharaonis*. In: MEER, V. et al. (Ed.) **Applied Myrmecology: a world perspective**. Boulder, 1990, p. 671-675.

EWING W. H.; DAVIS, B. R. Biochemical characterization of *Citrobacter diversus* (Burkey) Werkenan and Gillen and designation of the neotype strain. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 22, p.12-18, 1986.

FACKLAM, R. R.; SAHM, D. F. Enterococcus. In: MURRAY; P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Ed.) **Manual of clinical microbiology**, 6^{ed}, Whashington: ASM Press, 1995.1482 p.

FARMER III, J.J. Enterobacteriaceae, Introduction and Identification. In: MURRAY; P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Ed.) **Manual of clinical microbiology**, 6^{ed}, Whashington: ASM Press, 1995.1482 p.

FONTANA, R.; DELABIE, J. H. C.; BRITO, T. A.; FERREIRA, S. L. Infecção hospitalar e formigas no Brasil, com um exemplo de propagação bacteriana por formigas num hospital do sudeste da Bahia. **Naturalia**, São Paulo, nº especial,1999.

FOSTER, J. L. M.; FOGLEMAN, J. C. Identification and ecology of bacterial communities associated with necrosis of three cactus species. **Applied Environmental Microbiology**, n. 59, p. 1-6, 1993.

FOWLER, . G.; BUENO, O. C.; SADATSUNE, T; MONTELLI, A. C. Ants as potencial vectors of pathogens in Brazil hospitals in the State of São Paulo, Brazil. **Insect Science and its Application**, v. 14, n. 3, p. 367-70, 1993.

GAVINI, F. J. ; MERGAERT, A., BEJI; C., MIELCAREK, D.; IZARD, K. KERSTERS; J. DE LAY. 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. Nov. as *Pantoea agglomerans* comb. Nov. description of *Pantoea dispersa* sp. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.39, p. 337-345.

GILLIGAN, P. H. *Pseudomonas* and *Burkholderia*. In: MURRAY; P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Ed.) **Manual of clinical microbiology**, 6^{ed}, Whashington: ASM Press, 1995.1482 p.

GLANCEY, B. M.; VANDER MEER, R. K.; GLOVER, A.; LOFGREN , C. S.; VINSON, S. B. 1981. Filtration of microparticules from liquids ingested by the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren. **Insect Sociaux**, v.28, n. 4, p. 395-401.

GRAEVENITZ, A. V. *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella* and other Nonfermentative Gram-negative bacteria. In: MURRAY; P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Ed.) **Manual of clinical microbiology**, 6^{ed}, Whashington: ASM Press, 1995.1482 p.

HEDGES, S. A. Ants, In D. MORELAND (Ed.) **Handbook of pest control**. 8th ed. Cleveland: Mallis Handbook and Technical Training Company, 1997. pp. 522-525.

HERTIG, M. ; WOLBACH, S. B. Studies on rickettsia –like micro-organisms in insects. **Journal of Medical Research**, v. 44, p. 329-374, 1924.

HOFFMANN, A. A.; TURELLI, M. Cytoplasmic incompatibility in insects. In: **Influenial passengers: inherited Microorganisms and arthropod reproduction**. S.L. O'NEILL, A.A. HOFFMANN, J.H. WERREN (Ed.) , pp. 42-80. Oxford: Oxford University Press, 1997.

HOLDOBLER, B., WILSON, E. O. 1990. **The ants**. Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press.

HOOPER-BUI, L.; RUST, M. K. Oral toxicity of Abamectin, Boric acid, Fipronil, and Hydramethylnon to laboratory colonies of argentine ants (Hymenoptera: Formicidae) **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n. 3, 2000.

HUGHES, D. E.; KASSIM, O. O.; GREGORY, J.; STUPART, M.; AUSTIN, L.; DUFFIELD, R. Spectrum of bacterial pathogens transmitted by Pharaoh's ants, **Laboratory Animal Science**, n. 39, p. 167-8, 1989.

HUNT, C. P. The emergence of enterococci as a source of nosocomial infections . **Brazilian Journal of Biomedical Science**, v. 55, n. 2, p. 149- 156, 1998.

HURST, L. D. The incidences and evolution of cytoplasmic male killers. **Proceedings of Royal Society London (B)** , London,v. 263, p. 97-104, 1991.

IPINZA- REGLA, J.; FIGUEROA, G.; OSORIO, J. *Iridomyrmex humilis*, "hormiga argentina", como vector de infecciones intrahospitalar. I- Estudio bacteriologico. **Folia Entomologica Mexicana** , n. 50, p. 81-96, 1981.

JAFFÉ, K. ; CAETANO, F; H.; SÁNCHEZ, P. , et al. Sensivity of ant (*Cephalotes*) colonies and individuals to antibiotics implies feeding symbiosis with gut microorganisms. **Canadian Journal of Zoology**, v. 6, n. 79, p. 1120-1124, 2001.

JEYAPRAKASH, A., HOY, M. A. Long PCR improves Wolbachia DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-tree arthropods species. **Insect Molecular Biology**, v.9, p. 393-405, 2000.

JOUVENAZ, D. P.; LORD, J. C.; UNDEEN, A H. Restricted ingestion of bacteria by fire ants. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 3, n. 68, p. 275-277, 1996.

KONEMAN, E. W. et al. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 5 ed. Philadelphia: JB. Lcott, 1997. 1395 p.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY; P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Ed.) **Manual of clinical microbiology**, 6°ed, Whashington: ASM Press, 1995.1482 p.

KLOTZ, J. H.; OI, D. H.; VAIL, K. M.; WILLIAMS, D. F. Laboratory evaluation of a boric acid liquid bait on colonies of *Tapinoma melanocephalum* Argentine ants and pharaoh ants (Hymenoptera: Formicidae) **Journal of Economic Entomology**, v. 89, n. 3, 1996.

KLOTZ, J. H.; VAIL, K. M.; WILLIAMS, D. F. Toxicity of a boric acid-sucrose water bait to *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) **Journal of Economic Entomology**, v. 90, n. 2, 1997.

KLOTZ, J. H.; GREENBERG L.; AMRHEIN, C.; RUST, M. K. Toxicity and repellency of borate-sucrose water baits to argentine ants (Hymenoptera : Formicidae) **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n. 4, 2000.

KREBS, C. J. **Ecological methodology**. 1 ed. New York: Harper & Row, 1989. 654 p.

LAVEN, H. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmatic incompatibility. **Nature**, v. 216, p. 383-384, 1967.

LENETTE, E. H. (Ed.) **Manual of clinical microbiology**, 3.ed. Washington: American Society of Microbiology, 1980.

MARTINS, M.A. Aspectos históricos das infecções hospitalares. In: OLIVEIRA, A.C., ALBUQUERQUE, C.P., ROCHA, L.C.M. (Ed.), **Infecções hospitalares: abordagem, prevenção e controle**, 1989. 466p.

McINTYRE, N. E.; RANGO, J.; FAGAN, W. F.; FAETH, S. H. Ground arthropod community structure in a heterogenous urban environment. **Landscape and urban planning**, n. 52, p. 257-74, 2001.

MIMICA, I.; MIMICA, L. M. J.; PIANTO, J. E.; YAUTI, K.; IWAMOTO, R.; TAMANAHA, S. Vetores animais e sua provável importância na transmissão de

infecções intra-hospitalares. **Anais M. do Hospital da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, São Paulo:1984.

MORAN, N. A.; BAUMANN, P. Phylogenetics of cytoplasmically inherited microorganisms of arthropods. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 9, p. 5-20, 1994.

OI, D. H.; WATSON, C. A.; WILLIAMS, D. F. Monitoring and management of red imported fire ants in a tropical fish farm. **Florida Entomologist**, v. 87, n. 4, 2004.

PASSERA, L. Characteristics of tramp species. In: WILLIAMS, D. F. (Ed). **Exotic ants: biology, impact and control of introduced species**. Boulder, p. 191-198, 1994.

PEÇANHA, M. P. **Formigas como vetor de propagação bacteriana no conjunto hospitalar de Sorocaba- SP**. Tese de Doutorado: Área de Microbiologia Aplicada, Rio Claro, 2000.

PEREIRA, R. M.; STIMAC, J. L. Biocontrol options for pest ants, **Journal of agricultural entomology**, v. 14, n. 3, p. 1997.

PETRALIA, R. S; VINSON, S. B. Feeding in larvae of imported fire ant, *Solenopsis invicta*: behavior and morphological adaptations. **Annals of Entomological Society of America**, v. 71, n.4, p.643-648, 1978.

PETRALIA, R. S; VINSON, S. B.. Developmental morphology of larvae and eggs of the imported fire ant, *Solenopsis invicta*. **Annals of Entomological Society of America**, v.72, n. 4, p. 472-484, 1979.

POLZ, M. F.; CAVANAUGH, C. M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3724-3730, 1998

ROBINSON, W. **Urban Entomology**: insect and mite pests in the human environment. Londres: Chapman & Hall, 1996. 430 p.

ROSARIO, G; LATORRE, A. ; MOYA, A. Bacterial endosymbionts of insects: insights from comparative genomics. **Environmental Microbiology**, v.6, n.11, p.1109-1122, 2004.

ROUSSET, F.; BOUCHON, D.; PINTUREAU, B.; JUCHAULT, P., SOLIGNAC, M. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. **Proceedings of Royal Society of London (B)**, London, v. 250, p. 91-98, 1992.

RUBIN, R. J.; HARRINGTON A. P.; POON, A.; DIETRICH, K.; GREENE, J. A.; MOIDUDDIN, A. The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City Hospitals. **Emerging Infectious Disease**, v. 5, n. 1., p. 9-17, 1999.

RUOFF, K.L. *Streptococcus*. In: MURRAY; P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Ed.) **Manual of clinical microbiology**, 6^{ed}, Whashington: ASM Press, 1995.1482 p.

RUST, M. K. Insecticides and their use in urban structural pest control, pp. 243-250. In: KRIEGER, R. (Ed.) **Handbook of pesticide toxicology**. San Diego: Academic, 2001.

RUST, M. K.; REIERSON, D. A.; KLOTZ, J. H. Delayed toxicity as a critical factor in the efficacy of aqueous baits for controlling argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 97, n. 3, 2004.

SAMESHIMA, S.; EISUKE H. KITADE, O.; NOBUHIRO, M.; MATSUMOTO, T. Phylogenetic comparison of endosymbionts with their host ants based on molecular evidence, **Zoological science**, v. 16, p. 993-1000, 1999.

SAUER, C.; STACKEBRANDT, E.; GADAU, J.; HOLLBOBLER, B.; GROSS, R. Systematic relationships and coespeciation of bacterial endosymbionts and their carpenter ant host species: proposal of a new taxon "*Candidatus blochmannia*" (gen. nov.), **International Journal of systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 50, p. 1877-86, 2000.

SCHRÖDER, D.; DEPPISH, H.; OBERMAYER, M.; KROHNE, G.; STACKEBRANDT, E.; HÖLDOBLER, B.; GOEBEL, W.; GROSS, R., Intracellular endosymbiotic bacteria of *Camponotus* (carpenter ants): systematics, evolution and ultrastructural characterization, **Molecular Microbiology**, n. 21, p. 479-89, 1996.

SILVA, H. P. M. **Bacteriologia: um texto ilustrado**. Teresópolis: Eventos, 531 p., 1999.

SOEPRONO, A. M.; RUST, M. K. Effect of delayed toxicity of chemical barriers to control Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae), **Journal of Economic Entomology**, v. 97, n. 6, p. 2021-28, 2004.

STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J. A.; LUCK, R. F.; WERREN, J. H. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. **Nature**, n. 361, p. 66-68, 1993.

TAYLOR, M. J.; CROSS, H. F.; ARCHER, J. P.; UNDERWOOD, A. P. 16 S r DNA phylogeny and ultrastructural characterization of *Wolbachia* intracellular bacteria of the filarial nematodes *Brugia malayi*, *B. pahangi*, and *Wuchereria bancrofti*. **Experimental Parasitology**, n.91, p. 356-361, 1999.

TEROSSI, D.A. C. **Monitoramento de formigas no Hospital "Sociedade Operária Humanitária", Limeira, SP**. Monografia: área de Entomologia Urbana, São Paulo, 2000.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Research**, v.22, p. 4673-4680, 2004.

TURNBULL, P. C. B.; KRAMER, J. M. *Bacillus*. In: MURRAY; P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Ed.) **Manual of clinical microbiology**, 6^{ed}, Whashington: ASM Press, 1995.1482 p.

TSUTSUI, N. D.; KAUPPINEM, S. N.; OYAFUSO, A. F.; GROSBERG, R. K. The distribution and evolutionary history of *Wolbachia* infection in native and introduced populations of the invasive argentine ant (*Linepithema humile*). **Molecular Ecology**, v.12, p. 3057-3068, 2003.

ULLOA-CHACON, P.; JARAMILLO, G. I., Effects of boric acid, fipronil, hydramethylnon, and diflubenzuron baits on colonies of Ghost Ants (Hymenoptera: Formicidae).**Journal of Economic Entomology**, v. 96, n.3, 2003.

VAIL, K. M.; WILLIAMS, D. F. Pharaoh ant (Hymenoptera : Formicidae) colony development after consumption of pyriproxyfen baits. **Journal of Economic Entomology**, v. 88, n. 6, 1995.

VAIL, K. M.; WILLIAMS, D. F.; OI, D. H. Perimeter treatments with two bait formulations of pyriproxyfen for control of pharaoh ants (Hymenoptera: Formicidae) **Journal of Economic Entomology**, v. 89, n. 6, 1996.

VAN BORM, S.; BILLEN, J; BOOMSMA, J. J. The diversity of microorganisms associated with *Acromyrmex* Leafcutter ants. **BMC Evolutionary Biology**, v. 2, p.9, 2002.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T. e LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in Eubacteria and application of finger-printing of bacterial genomes. **Nucleic Acid Research**, v.19, p. 6823-6831, 1991.

YANG-LEE, C.; LEE, L.C; NA, J.P.S.; LOKE, P.Y.; LIM, K.T; TEO, E. H.H. Evaluation of Metoprene Granular baits against foraging Pharaoh ants, *Monomorium pharaonis* (Hymenoptera: Formicidae) **Sociobiology**, v. 41, n. 3, 2003.

YURMAN, D.; DOMINGUEZ-BELLO, M. G. Bacteria present in the gut of two neotropical Cephalotini ants, *Cephalotes atratus* and *Zacryptocerus cf. pusillus*. **Folia Microbiológica**, n. 38, v. 6, 515-516, 1993.

WENSELEERS, T.; ITO, F.; VAN BORM, S., et al., Widespread occurrence of the micro-organism *Wolbachia* in ants. **Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences**, London, v. 265, p. 1447-1452, 1998.

WENSELEERS, T.; SUNDSTROM, L.; BILLEN, J. Deleterious *Wolbachia* in the ant *Formica truncorum*. **Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences**, London, v. 269, p. 623-629, 2002.

ZARZUELA, M. F. M.; RIBEIRO, M. C.C.; CAMPOS-FARINHA, A. E. C. Distribuição de Formigas Urbanas em um hospital da região Sudeste do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 85-7, 2002.

ZARZUELA, M.F.M.; CAMPOS-FARINHA, A.E.; PEÇANHA, M. P. Evaluation of urban ants (Hymenoptera: Formicidae) as carriers of pathogens in residential and industrial environments: I. Bacteria. **Sociobiology**, v. 45, n. 1, 2005.

10- Índice de Figuras

Figura 1: Iscas utilizadas no modelo de controle: A – tubo plástico contendo isca sólida no seu interior, B – tubo de vidro contendo isca líquida.....pág.28

Figura 2: Dissecção de operária da espécie *T. melanocephalum*. A: operária da espécie *T. melanocephalum* sobre zaragatoa; B: Dissecção do gáster da operária; C: rompimento do gáster da formiga com pinça e retirada do conteúdo do trato digestório; D: conteúdo do trato digestório sobre zaragatoa estéril. Aumento 50X.
.....pág.31

Figura 3: Dissecção de operária da espécie *C. rufipes*. A: operária da espécie *C. atriceps* sendo dissecada com pinças sobre zaragatoa estéril; B: retirada do conteúdo do trato digestório com pinças; C: conteúdo do trato digestório sobre zaragatoa estéril. Aumento 40X.....pág.32

Figura 4: Tubo de ensaio contendo BHI (“*Brain Heart Infusion*”), meio rico para crescimento de bactérias.....pág.34

Figura 5: Provas bioquímicas utilizadas para Bacilos Gram Negativos: EPM, Mili, e Citrato de Simons estéreis (esquerda) e após o crescimento de microrganismos (direita), placa de ágar Dnase com crescimento de colônias e formação de halo.....
.....pág.35

Figura 6: Índice de infestação de formigas nos pontos onde foi realizado controle com iscas, no Hospital das Clínicas da UNESP de Botucatu.....pág.43

Figura 7: Distribuição relativa de formigas nos setores hospitalares do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu, SP, durante o período de estudo.....pág.44

Figura 8: Índice de infestação relativa das espécies de formigas presentes no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu, durante o período de controle, revelando alteração na espécie dominante.....pág.45

Figura 9: Operárias de formigas predominantemente encontradas nos hospitais estudados. A: *Brachymyrmex sp.1* (50X), B: *P. longicornis* (40X), C: *M. floricola* (40X), D: *M. pharaonis* (40X), E: *C. rufipes* (6X), F: *T. melanocephalum* (50X).....pág. 46

Figura 10: Esquema da planta do Pavimento Térreo do Hospital das Clínicas da UNESP-Botucatu, contendo os pontos de coleta e amostragem e a distribuição das espécies de formigas em outubro/2003.....pág. 47, 48, 49

Figura 11: Índice de infestação total de formigas presentes no Centro de Saúde de São Carlos, SP.....pág. 54

Figura 12: Distribuição relativa das formigas nos setores hospitalares do Centro de Saúde de São Carlos, SP.....pág.54

Figura 13: Índice de infestação relativa das espécies de formigas presentes no Centro de Saúde de São Carlos, SP.....pág.55

Figura 14: Esquema da planta do Pavimento Térreo do Centro de Saúde de São Carlos, contendo os pontos de coleta e amostragem e a distribuição das espécies de formigas em março/2004.....pág. 56,57,58,59

Figura 15: Gel de agarose da extração de DNA de *T. melanocephalum*.....pág.71

Figura 16: Gel de agarose da amplificação, com primer 16 S.....pág.71

Figura 17: alinhamento do segmento de DNA do gene 16S, obtido com o primer F27A (forward) de cerca de 327 pb de *Wolbachia* sp., endosimbionte de *T. melanocephalum*, com segmento correspondente das seqüências obtidas com endobactéria de *Drosophila simulans* (código do GenBank X64265) . *W. pipientis*, endobactéria de *D. simulans* (código AY 833061), e *Wolbachia* sp., endobactéria de *Pulsimulans* sp. (código AY 335934).....pág. 72

Figura 18: alinhamento do segmento de DNA do gene 16S, obtido com o primer R1492T de cerca de 485 pb de *Wolbachia* sp., endosimbionte de *T. melanocephalum*, com segmento correspondente das seqüências obtidas com endobactéria de *Drosophila simulans* (código do GenBank X64265) . *W. pipientis*, endobactéria de *D. simulans* (código AY 833061), e *Wolbachia* sp., endobactéria de *Pulsimulans* sp. (código AY 335934).....pág. 73

Figura 19: Índice de infestação de formigas presentes no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu, período: jan/2003 a dez/2004.....pág. 74

11- Índice de Tabelas

Tabela 1: Ocorrência relativa das espécies de formigas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu nos anos de 1989, 1994 e no levantamento inicial deste estudo, realizado em 2003, SP.....pág. 42

Tabela 2: Formigas coletadas no Hospital das Clínicas da UNESP- Botucatu e bactérias isoladas à partir do trato digestório, corpo e ambiente de coleta.....pág. 51,52

Tabela 3: Abundância relativa das espécies de formigas no Centro de Saúde de São Carlos, SP.....pág. 53

Tabela 4: Formigas coletadas no Centro de Saúde de São Carlos e bactérias isoladas a partir do trato digestório, corpo e ambiente de coleta.....pág. 61,62

Tabela 5: Freqüências das bactérias isoladas do trato digestório de *T. melanocephalum*, *M. pharaonis*, *M. floricola*, *P. longicornis* e *C. atriceps* em laboratório.....pág. 63

Tabela 6: Bactérias isoladas das colônias de laboratório e superfície dos corpos de *M. floricola* e *P. longicornis*.....pág. 64

Tabela 7: Bactérias isoladas a partir de larvas de colônias de laboratório da espécie *M. pharaonis*.....pág. 65

Tabela 8: Bactérias isoladas a partir de larvas de colônias de laboratório da espécie *M. floricola*.....pág. 66

Tabela 9: Distribuição, número de espécies de bactérias isoladas nas amostras e número efetivo de espécies (ENS).....pág. 68

Tabela 10: Número efetivo de espécies isoladas de acordo com ambiente de isolamento.....pág. 69

Tabela 11: Índice de Morisita-Horn para sobreposição de nichos do trato digestório, superfície corporal e ambiente nos Hospitais de Botucatu (hosp A) e São Carlos (hosp B).....pág. 69

Tabela 12: Índice de Morisita-Horn para sobreposição de nichos de tratos digestórios de formigas de laboratórios, das espécies *M. floricola*, *M. pharaonis*, *P. longicornis*, *C. atriceps* e *T. melanocephalum*.....pág. 70

Tabela 13: Índice de Morisita –Horn para sobreposição de nichos de amostras de larvas e ninhos das espécies *M. floricola*, *M. pharaonis* e *P. longicornis*.....pág. 70

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)