Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Avaliação do potencial das formigas como vetores mecânicos de micobactérias em hospital especializado na assistência de pacientes de tuberculose do estado de São Paulo.

Ana Paula Macedo Ruggiero Couceiro

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Epidemiologia

Orientador: Professor Dr. Péricles Alves Nogueira

São Paulo

2012

Avaliação do potencial das formigas como vetores mecânicos de micobactérias em hospital especializado na assistência de pacientes de tuberculose do estado de São Paulo.

Ana Paula Macedo Ruggiero Couceiro

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Epidemiologia

Orientador: Professor Dr. Péricles Alves Nogueira

São Paulo

2012

É expressamente proibida a comercialização deste documento tanto na sua forma expressa como na forma eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, Instituição e ano da tese / dissertação.

Dedicatória

Aos meus dois grandes amores.

O primeiro escolhido pelo meu coração: Adriano

Muito mais que um simples marido, meu porto seguro.

Obrigada por todo o amor, a paciência e a ajuda para que este

meu projeto fosse concluído.

O segundo fruto desta união, Pedro.

Meu raio de luz e minha fonte de energia e alegria extremas.

Sem vocês dois eu nunca estaria completa.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me fazer entender que tudo tem a hora certa para acontecer.

Ao Prof. Dr. Péricles Alves Nogueira, meu orientador, por acreditar nesta pesquisa e me aceitar como orientada. Pela paciência e compreensão em todos os momentos difíceis e decisivos. E por todo o conhecimento adquirido.

À Dra. Eliana Roxo pela idéia desta pesquisa, pelo apoio, pelos conselhos, por toda a colaboração e confiança. E acima de tudo pela infra-estrutura concedida na execução da pesquisa.

À Dra Regina Maura Cabral de Melo Abrahão por me apresentar ao Dr. Péricles, pela amizade, os excelentes conselhos e por toda a ajuda.

À Elied Costa por todo o apoio no início desta pesquisa, pelos bons momentos no laboratório e pela amizade construída.

À Dra Lúcia Baldassi por toda a colaboração na análise microbiológica das minhas amostras.

À Dra Ana Eugenia de Carvalho Campos pela identificação das formigas, colaborações nas coletas e nos artigos científicos.

À Dra. Cristina Dib e a Marilú por toda a colaboração na parte laboratorial desta pesquisa.

À diretoria e a equipe de funcionários do Hospital selecionado.

À Dra Margareth Dalcomo, pela colaboração do Centro de Referencia Professor Hélio Fraga nas análises moleculares.

À Dra. Maria Alice Teles por encaminhar meu pedido de colaboração aos pesquisadores do Centro de Referencia Professor Hélio Fraga.

Ao Dr. Jesus Pais Ramos, por aceitar participar desta pesquisa, por toda a colaboração, boa vontade e imensa ajuda na realização da parte molecular.

Ao Dr. Paulo Caldas pelas análises moleculares e por toda a perseverança para conseguirmos bons resultados.

A todos os funcionários, pesquisadores e estagiários, principalmente a Nicole, Bianca e Márcia que colaboram com as minhas análises.

Aos meus pais Gilberto e Clara que nestes últimos dois anos, me ensinaram a não desistir diante dos desafios. Agradeço por minha educação, pelo apoio incondicional e as inúmeras palavras de incentivo e conforto nos momentos difíceis.

Aos meus sogros Mário e Ana Maria que me ajudaram a conciliar o doutorado e os cuidados do meu pequeno Pedro. E que não mediram esforços para me ajudar a concluir esta etapa.

Às minhas queridas amigas do curso de Saúde Pública, Neussana, Clarice e Day pela amizade, pelas risadas, pelo aprendizado e por todos os excelentes momentos que passamos juntas!!

Aos professores do curso de Saúde Pública pelos valiosos conhecimentos adquiridos.

As minhas primas Natalia e Izabele pelo auxílio nas correções.

E a todos que me ajudaram direta ou indiretamente a desenvolver e concluir esta pesquisa.

RESUMO

COUCEIRO-RUGGIERO APM. **Avaliação de formigas como vetor mecânico de micobactérias em hospital especializado na assistência de pacientes de tuberculose do estado de São Paulo**. São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública – FSP].

Introdução - A urbanização desencadeia inúmeros transtornos, como a disseminação de artrópodes e, conseqüentemente, de doenças veiculadas pelos mesmos. As formigas são muito adaptáveis e se beneficiam com a convivência humana. Nos hospitais, elas podem ser vetores mecânicos de inúmeras bactérias, e a diversidade de espécies encontradas nestes ambientes, causam preocupação pelo risco potencial à saúde pública. O aumento das infecções hospitalares envolvendo micobactérias ambientais, com surtos no Brasil entre 1998 a 2009 em 23 estados alarmou os órgãos e profissionais de saúde pública. **Objetivos** - Avaliar o potencial de formigas como vetores de micobactérias em um hospital especializado no atendimento de doentes com tuberculose. **Métodos** - Foram realizadas seis coletas de formigas em diferentes áreas do hospital no período de 2009 a 2010, que foram semeadas em meios de cultura de Löwenstein-Jensen e de Stonebrink para isolamento de micobactérias. As culturas sugestivas foram submetidas à coloração de Ziehl-Neelsen para bacilos álcool-ácido resistentes e identificação por métodos moleculares (PRA para o gene *hsp*65 com o par de primers *TB*11 e *TB*12 gênero-específico e sequenciamento genético do DNA). **Resultados** - Do total de 247 amostras de formigas coletadas e semeadas, 70% das formigas pertenciam à espécie *Tapinoma melanocephalum*, 25% a espécie *Dorymyrmex* sp., 3% a espécie *Camponotus* sp. e 2% a espécie *Pheidole* sp., dados similares foram observados anteriormente em pesquisas realizadas em hospitais. Quinze amostras apresentaram bacilos álcool-ácido resistentes de crescimento rápido. Nos métodos moleculares, doze pertenciam ao Gênero *Mycobacterium*. No PRA-*hsp* 65, e no sequenciamento genético do DNA, quatro amostras foram identificadas quanto à espécie (duas *Mycobacterium chelonae*, uma

Mycobacterium parafortuitum e uma *Mycobacterium murale)*, quatro micobactérias com resultados idênticos no PRA e não identificadas no sequenciamento foram sugestivas de uma nova espécie, e duas amostras não foram identificadas. *Mycobacterium chelonae* isolada nesta pesquisa foi previamente descrita como agente causador de abscessos em humanos. **Conclusão** - Estes dados confirmam a presença de micobactérias veiculadas por formigas no ambiente hospitalar, representando um potencial vetor mecânico destas para pacientes e profissionais de saúde, principalmente em infecções nosocomiais.

Descritores: formigas, micobactérias, micobactérias de crescimento rápido, hospital, infecção nosocomial, vetor mecânico, ambiente hospitalar.

ABSTRACT

COUCEIRO-RUGGIERO APM. **Evaluation of ants as potential mechanical vectors of mycobacteria in a hospital specializing in assistance to TB patients, the state of São Paulo.** São Paulo; 2012. [PHD Thesis - Faculdade de Saúde Pública (University of São Paulo Public Health College)].

Introduction- Urbanization triggers numerous disorders, such as the dissemination of arthropods and, consequently, dissemination of diseases transmitted by them. Some ant species are very adaptable to the human environment. At hospitals, once they are mechanical vectors of bacteria, and the diversity of species found in these environments, they can represent a potential risk to public health. The increase of nosocomial infections involving environmental mycobacteria, with outbreaks in Brazil from 1998 to 2009 in 23 states called the interest of health professionals and health agencies. **Purpose** - Evaluate the potential of ants as vectors of mycobacteria in a hospital specialized in the care of patients with tuberculosis. **Methods** Samples of ants were collected from different areas of the hospital from 2009 to 2010, and workers were inoculated in Löwenstein-Jensen and Stonebrink media for mycobacteria isolation. The suggestive cultures were subjected to Ziehl-Neelsen stain for acid-fast bacilli and identification were performed by molecular methods (PRA for the *hsp65* gene with the pair of primers TB11 - TB12 and genetic sequencing). **Results** - The total of 247 samples of ants collected and sown, 70% belonged to species of ants *Tapinoma melanochepalum*, 25% *Dorymyrmex* sp.,3% *Camponotus* sp. and 2% *Pheidole* sp., data similar with previous studies conducted in hospitals. Fifteen fast-growing mycobacteria were isolated. In molecular methods, twelve belonged to the genus *Mycobacterium*. In PRA-*hsp*65, and the genome sequencing of DNA, four samples were identified at species level (two *Mycobacterium chelonae*, one *Mycobacterium parafortuitum* and one *Mycobacterium murale*), four mycobacteria with similar results in the PRA and not identified in the sequencing, suggestive of a new species and two unidentified

samples. *M. chelonae* was previously reported as causative agent of abscess in humans. **Conclusions** - These results confirm the presence of mycobacteria carried by ants in the hospital, representing a potential mechanical vector for these patients and healthcare professionals, particularly in nosocomial infections.

Key words: ants, mycobacteria, fast-growing mycobacteria, hospital, nosocomial infection, mechanical vector

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO **1**

2 OBJETIVOS **24**

2.1 Objetivo Geral **24**

2.2 Objetivos Específicos **24**

3 MÉTODOS **25**

3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO **25**

3.2 LOCAL DA COLETA **25**

3.2.1 Hospital selecionado **25**

3.2.2 Histórico do Hospital selecionado **25**

3.2.3 Características atuais do atendimento neste Hospital **26**

3.2.4 Características físicas do Hospital **27**

3.3 TÉCNICAS DE COLETA DAS FORMIGAS **29**

3.4 MÉTODO DE COLETA **30**

3.4.1 Método de coleta manual **31**

3.4.1.1 Diretamente sobre a formiga **31**

3.4.1.2 Método de coleta com pincel **31**

3.4.2 Método de coleta com isca atrativa **32**

3.4.3 Identificação dos microtubos contendo formigas **33**

3.5 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE FORMIGAS **33**

3.6 ISOLAMENTO DE MICOBACTÉRIAS ORIUNDAS DAS FORMIGAS COLETADAS NO HOSPITAL **34**

3.6.1 Meios de cultura para isolamento e identificação de micobactérias **34**

3.6.2 Processamento dos exemplares de formiga para o isolamento de micobactérias em meios de cultura **34**

3.6.3. Leitura dos meios de cultura **36**

3.6.4 Colorações utilizadas na identificação das micobactérias **38**

3.6.5 Identificação fenotípica de micobactérias **38**

3.6.5.1 Avaliação do tempo de crescimento **39**

3.6.5.2 Avaliação da produção de pigmento das culturas **39**

3.7 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS 40

3.7.1. Identificação por PCR **40**

3.7.1.1 Extração de DNA micobacteriano **41**

3.7.1.2 Amplificações **42**

3.7.1.3 Eletroforese do produto amplificado **42**

3.7.2 *PCR- restriction enzyme analysis* (PRA) **43**

3.7.2.1 Preparação das amostras **43**

3.7.2.2. Amplificação **44**

3.7.2.3 Análise de restrição **44**

3.8 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DO DNA DAS MICOBACTÉRIAS ISOLADAS 45

3.8.1 Amplificação das micobactérias isoladas com os alvos selecionados **45**

3.8.2 Purificações e sequenciamento do material amplificado **47**

3.8.2.1 Precipitação do material **47**

3.8.2.2 Desnaturação com formamida **48**

3.8.3 Sequenciamento genético do DNA **48**

3.8.4 Análise dos resultados do sequenciamento genético do DNA **49**

3.9 ÁRVORES FILOGENÉTICAS **50**

4 RESULTADOS **52**

4.1 FORMIGA **52**

4.2 FORMIGAS OBTIDAS SEGUNDO O MÉTODO DE COLETA EMPREGADO **54**

4.2.1 Método de coleta manual diretamente sobre a formiga **54**

4.2.2 Método de coleta com isca atrativa **55**

4.2.3 Método de coleta com isca atrativa **56**

4.3 OCORRÊNCIA DAS FORMIGAS NO HOSPITAL SEGUNDO LOCAL DA COLETA **56**

4.4 ESPÉCIES DE FORMIGAS COLETADAS **64**

4.5 CULTURA E ISOLAMENTO DE MICOBACTÉRIAS A PARTIR DAS FORMIGAS **66**

4.5.1 Culturas com a presença de crescimento suspeito de micobactérias **66**

4.5.2 Identificação fenotípica de micobactérias **70**

4.6 MÉTODOS MOLECULARES **73**

4.6.1 Resultados do método de PCR **73**

4.6.2 PCR - restriction enzyme analysis (PRA) **74**

4.6.3 Sequenciamento genético do DNA **76**

4.7 ÁRVORE FILOGENÉTICA **80**

5 DISCUSSÃO **85**

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS **101**

7 REFERÊNCIAS **103**

ANEXOS

Anexo 1 - **117**

Anexo 2 - **118**

CURRÍCULO LATTES

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Formigas coletadas segundo o mês e o ano da coleta, em hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose, 2009-2010 **53**

Tabela 2 - Formigas coletadas pelo método manual e com isca atrativa, nos diferentes ambientes do hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose no estado de São Paulo, 2009-2010. **60**

Tabela 3 - Resultados das culturas obtidas de formigas segundo o local da coleta realizada em hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose no estado de São Paulo, 2009 – 2010 **68**

Tabela 4 - Resultado das culturas isoladas de formigas, segundo a avaliação da produção de pigmento, coletadas no, em hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose no estado de São Paulo, 2009 - 2010. **72**

Tabela 5 - Descrição dos fragmentos formados pelo método de PRA e a correlação com a espécie de micobactéria isoladas em formigas coletadas no hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose no estado de São Paulo, 2009-2010 **75**

Tabela 6 - : Espécies de micobactérias identificadas pelo sequenciamento de três diferentes alvos, isoladas de formigas coletadas no hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose do estado de São Paulo, 2009 - 2010. **79**

Tabela 7 - Espécies de formigas em que foram isoladas micobactérias, segundo o local da coleta no hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose do estado de São Paulo, 2009 - 2010. **84**

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Frequência de formigas coletadas segundo os meses em que as coletas foram realizadas , em hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose, 2009 - 2010. **54**

Gráfico 2 - Ocorrência das 174 formigas coletadas nas áreas de convívio dos pacientes internos em hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose no estado de São Paulo, 2009 -2010 **61**

Gráfico 3 - Frequência de espécies de formigas coletadas no hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose no estado de São Paulo, 2009 - 2010 **65**

Gráfico 4 - Resultado das culturas segundo a avaliação dos métodos de coloração, obtidas de formigas coletadas no hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose no estado de São Paulo, 2009 - 2010. **69**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Solarium do hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose no estado de São Paulo, 2009 - 2010.. **62**

Figura 2 - Lixeira destampada localizada no solarium do hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose no estado de São Paulo, 2009 - 2010. **63**

Figura 3 - Sala multiuso do hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose, 2009 - 2010. **64**

Figura 4 - Árvore filogenética concatenada dos genes hsp65, rpoB e 16S rRna construída através do método de Neighbor-Joining, com modelo de correção de Kimura-2 parâmetros e valores de bootstrap estimados a partir de 100 replicações, da amostra de micobactéria identificada como M. chelonae isolada de formiga no hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose no estado de São Paulo, 2009- 2010.. **81**

Figura 5 - Árvore filogenética concatenada dos genes *hsp*65, *rpoB* e 16S r*Rna* construída através do método de Neighbor-Joining, com modelo de correção de Kimura-2 parâmetros e valores de bootstrap estimados a partir de 100 replicações, da amostra de micobactéria identificada como *M. murale* isolada de formiga no hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose no estado de São Paulo 2009-2010. **82**

SIGLAS UTILIZADAS

AIDS = Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (sigla de "Acquired Immuno Deficiency Syndrome")

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CDC = Center for Disease Control and Prevention

DNA = Ácido desoxirribonucleico (sigla de Desoxiribonucleic acid).

HIV = Vírus da Imuno deficiência humana (sigla de "Human Immunodeficiency Vírus").

HPLC = Cromatografia Líquida de Alta Performance (sigla de "High Performance Liquid Cromatography").

MCR = Micobactérias de Crescimento Rápido.

MNT = Micobactérias Não Tuberculosas

PCR = Reação de Polimerase em cadeia (sigla de "Polimerase Chain Reaction")

RFLP = Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição (sigla de "Restriction Fragment Lenght Polymorphism").

TB-MDR = Tuberculose Multidrogarresistente.

WHO = World Health Organization.

1 INTRODUÇÃO

Os processos de urbanização desencadeiam transtornos como o crescimento exacerbado e desordenado da população, contaminação da água e a dificuldade de controle sanitário, provocando, assim, a disseminação de artrópodes e a propagação de doenças por estes veiculadas. Por esta razão, estes animais estão entre aqueles que mais afetam a qualidade de vida humana, constituindo um problema crescente de saúde pública (BUENO e CAMPOS-FARINHA, 1998; CAMPOS-FARINHA et al., 2002; OLIVEIRA e CAMPOS-FARINHA, 2005; FREITAS e TEIXEIRA, 2007; PESQUERO et al., 2008).

As cidades são habitats específicos e um dos produtos mais característicos do homem. As intensas modificações provocadas pela urbanização propiciam um empobrecimento da composição de espécies e favorecem o surgimento de microclimas caracterizados pelo aumento da temperatura do ar e do solo. Estas circunstâncias impossibilitam a sobrevivência de muitos animais, e o ecossistema urbano torna-se biologicamente não saturado e propício para espécies capazes de se adequar a uma nova realidade e obter vantagens das condições encontradas (McINTYRE, 2000; CAMPOS-FARINHA et al., 2002).

No ambiente urbano, muitas espécies alcançaram densidades altas, obtendo posições de dominância pela ausência de competidores e de pouca pressão de inimigos predadores e de parasitóides.

Entre estas espécies, as formigas foram as que melhor se adaptaram e se beneficiaram da convivência humana, com uma maior diversidade nas regiões tropicais. Estima-se que existam cerca de 18.000 espécies de formigas em todo o mundo. No Brasil, já foram descritas 2.000 espécies, dentre as quais, menos de 1%

pode ser considerada praga urbana, e apenas 50 espécies estão adaptadas ao ambiente urbano, apresentando danos à saúde pública, principalmente devido à íntima associação com o homem (BUENO e CAMPOS-FARINHA, 1999; CAMPOS-FARINHA et al., 2002; OLIVEIRA e CAMPOS-FARINHA, 2005; SANTOS et al., 2009).

A presença de formigas em fábricas de alimentos, padarias, restaurantes, escritórios, instituições de pesquisa, biotérios, zoológicos, museus, cabines de eletricidade e centrais telefônicas pode provocar sérios danos. No ambiente hospitalar, é considerado um risco ainda maior, devido sua capacidade de transportar microrganismos patogênicos, o que constitui um perigo potencial à saúde pública, uma vez que possibilita a associação direta com o problema de infecção hospitalar (BUENO e CAMPOS-FARINHA, 1999; SANTOS et. al., 2001; SANTOS et. al. 2009; TANAKA et. al., 2007).

Os artrópodes de importância médica podem ser classificados como vetores biológicos e vetores mecânicos de diversos patógenos (LESER et al., 2000).

São biológicos quando o agente se desenvolve ou se multiplica no vetor, sendo parte essencial e participando do ciclo evolutivo do agente (LESER et al., 2000; SCHULLER, 2004).

Formigas não são considerados vetores biológicos. Estudo realizado por Jaffé e colaboradores, em 2001, conseguiu identificar mais de dez tipos de microrganismos diferentes presentes no intestino de formigas da espécie *Cephalotes pusillus* (Cephalotini), que eram resistentes a diferentes tipos de antibióticos ou antifúngicos (nistatina, penicilina, e ampicilina). As bactérias encontradas pertenciam aos gêneros: *Corynebacterium, Brevibacterium, Sphingobacterium, Ochrobactrum,*

Myroides, Brevundimonas, Alcaligenes, Stenotrophomonas, Moraxella e *Pseudomonas*. Estas bactérias são encontradas com facilidade, vivendo livres no solo, sugerindo que as formigas, provavelmente, alimentaram-se das bactérias encontradas nas superfícies foliares e no solo, as quais, por sua vez, se reproduziram em seus tratos digestórios, mas sem transmiti-las. .

Os vetores mecânicos, entretanto, agem como transportadores de agentes infectantes (bactérias, vírus ou fungos) desde o reservatório até o hospedeiro em potencial, causando agravos à saúde humana (LESER et al, 2000). As formigas são vetores mecânicos que podem contaminar-se ao entrar em contato com material que contenha tais agentes, transportá-los pelo ambiente através de suas pernas e corpo, podendo depositá-los eventualmente em alimentos ou fômites (BUENO e CAMPOS-FARINHA, 1999; ZARZUELA et al., 2005; CINTRA, 2006; COSTA et al., 2006b; ZARZUELA et al., 2007; GUERRA e CONCEIÇÃO, 2010).

Pesquisas realizadas em ambientes hospitalares da Inglaterra, da Alemanha, de países do Leste europeu (BEATSON, 1972; EDWARDS e BAKER, 1981; EICHLER, 1990) e do continente americano, como Chile (IPINZA-REGLA et al., 1981), Estados Unidos (WILLIAMS, 1989) e Brasil (BUENO e FOWLER, 1994; BUENO e CAMPOS-FARINHA, 1999; COSTA et al., 2006b), confirmam este fato.

Infecções hospitalares ou nosocomiais então entre as maiores preocupações da área da saúde e têm despertado grande interesse no meio científico, devido à promoção de elevadas taxas de morbimortalidade de pacientes hospitalizados. A infecção nosocomial caracteriza-se como qualquer processo infeccioso adquirido no ambiente hospitalar, diagnosticada em pacientes durante a sua internação, ou

detectada apenas após a sua alta. Estudos revelam que o índice de doenças nosocomiais encontra-se entre 3,8 e 10% em países desenvolvidos, podendo aumentar cerca de 50% em países em desenvolvimento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004; TANAKA et al., 2007; PESQUERO et al., 2008; MAIA et al., 2009).

No Brasil, estas infecções são caracterizadas como emergentes, mas são raros os relatos de surtos, casos ou investigações, principalmente por subnotificações e dificuldades de diagnósticos (FONTANA, 2008; GUERRA e CONCEIÇÃO, 2010).

As infecções hospitalares cresceram na mesma proporção do desenvolvimento de tecnologias invasivas (sondas, cateteres, entre outros). Entretanto, as informações dos profissionais de saúde sobre as práticas para preveni-las não acompanham o seu desenvolvimento. A ocorrência das infecções depende da existência de uma fonte de infecção, da transmissão do agente patogênico, da susceptibilidade do paciente e de fatores como as condições sanitárias e a presença de vetores mecânicos de microrganismos patogênicos (QUIRINO, 1987; DELABIE et al., 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004; TANAKA et al., 2007; MAIA et al., 2009). Muitas das infecções nosocomiais são resultados de falhas em processos de esterilização e desinfecção de equipamentos, colaborando para a existência de condições adequadas para a proliferação destes patógenos (FONTANA, 2008; PITOMBO et al., 2009; GUERRA e CONCEIÇÃO, 2010).

Segundo Delabie e colaboradores (2002): “diferentes problemas contribuem em manter as taxas elevadas das infecções nosocomiais”. No Brasil, como em outros países, o problema das formigas e de outros insetos em ambiente hospitalar

raramente foi tido como algo preocupante pelo meio médico, apesar de entomologistas alertarem para o risco nos meios científicos, há tempos. É difícil fazer uma correlação direta entre a presença de formigas e a infecção hospitalar no Brasil, mas as evidências mostram que:

1) existem muitas espécies de formigas nos hospitais brasileiros (praticamente as mesmas encontradas nas residências), local onde, teoricamente, qualquer forma de vida não humana é banida;
2) a mirmecofauna dos hospitais brasileiros é bem mais diversa do que em países do hemisfério Norte;
3) algumas espécies de formigas são anormalmente comuns neste ambiente;
4) certas espécies são atraídas por instrumentos cirúrgicos e material estéril (EICHELER, 1990);
5) outras espécies, ou as mesmas, são comprovadamente vetores de uma grande quantidade de microrganismos patogênicos ao ser humano (PEÇANHA, 2000);
6) mesmo se a probabilidade de uma formiga ser vetor eficiente de algum microrganismo for baixa (FOWLER et al., 1995), o tipo de atividade desenvolvida por este inseto, e a frequência com a qual é encontrado, fazem deste excelente candidato a vetor intra-hospitalar de patógenos. Consequentemente, a presença de formigas num hospital deve ser considerada, em primeiro lugar, como um problema de higiene pública elementar.

As primeiras descrições de formigas como vetores mecânicos de bactérias ocorreram na Inglaterra (BEATSON, 1972).

No Brasil, os primeiros levantamentos da presença destes insetos em hospitais foram realizados em 1980, em hospitais do Estado de São Paulo, onde 14 espécies de formigas foram encontradas e estudos bacteriológicos demonstraram o seu potencial como vetores mecânicos de bactérias como: *Staphylococcus*, *Serratia*, *Klebsiella e Acinetobacter* (EDWARDS e BAKER, 1981; EDWARDS, 1986; QUIRINO, 1987; EICHELER, 1990; FOWLER et al., 1993).

O elevado número de espécies de formigas presentes em hospitais brasileiros é justificado por alguns fatores como as características estruturais das edificações de saúde (permitindo a instalação dos ninhos); a facilidade de acesso ao ambiente externo e a proximidade das residências (que estimulam a migração destes insetos); a circulação de grande número de pessoas, que através de suas vestimentas e objetos podem transportá-las; procedimentos inadequados de gestão, como embalagens de medicamentos, que podem transportar ninhos para o ambiente interno e, ainda, a disponibilidade de alimento que constitui um atrativo extra (SANTOS et al., 2001; ZARZUELA et al., 2002; MOREIRA et al., 2005; OLIVIERA e CAMPOS-FARINHA, 2005; PESQUERO et al., 2008).

Além disso, características biológicas inerentes às formigas também colaboram para sua vasta infestação, dentre as quais: o seu pequeno tamanho; poliginia (a presença de muitas rainhas coabitando o mesmo ninho); mobilidade das colônias; ausência de comportamento agressivo entre indivíduos de diferentes ninhos de uma mesma área (unicolonialismo); capacidade reprodutiva; grande mobilidade em busca de alimento podendo percorrer até 200 m a partir do ninho e com velocidade de cerca de três cm por segundo, e a dieta generalista, tornando-as muito bem adaptadas ao ambiente urbano e possibilitando sua circulação em vários locais

dos hospitais (BUENO e CAMPOS FARINHA, 1999; ZARZUELA et al., 2002; CAMPOS-FARINHA e BUENO, 2004; MOREIRA et al., 2005; OLIVEIRA e CAMPOS-FARINHA, 2005; TANAKA et al., 2007).

A presença de colônias de formigas em hospitais possibilita a contaminação de equipamentos eletrônicos, objetos, roupas de cama e áreas de tratamento intensivo, aumentando os riscos de infecções hospitalares, uma vez que os pacientes internados podem encontrar-se imunodeprimidos. Além disso, a ausência de aversão das pessoas às formigas e o fato de não associá-las à transmissão de agentes infecciosos ou à sujeira, colaboram para a dispersão destes animais (WETLER et al., 2005; CINTRA, 2006).

A população em geral considera as formigas limpas e não consegue associá-las a transmissão de doenças. Isto é comprovado quando formigas são encontradas em alimentos como: doces, açúcar, bolos entre outros. A reação imediata da maioria das pessoas é retirá-las do alimento e ingeri-lo em seguida. Este comportamento não é observado em alimentos com a presença de outros artrópodes, como baratas. Além disso, a população também não considera o fato de que formigas alimentam-se de indivíduos mortos, que podem estar contaminados por muitos patógenos, possibilitando o carreamento destes.

Os levantamentos realizados confirmam a presença deste artrópode nas residências e nos hospitais, onde atua como vetor mecânico de patógenos e interfere na higidez de alimentos nos ambientes hospitalares. As formigas identificadas em hospitais brasileiros pertencem principalmente a três subfamílias: Dolichoderinae (*Dorymyrmex* sp., *Linepithema humile, Tapinoma melanocephalum*), Formicinae (*Brachymyrmex* spp., *Camponotos arboreus;*

Camponotos atriceps, Camponotos rufipes, Paratrechina longicornis) e Myrmicinae (*Crematogaster* spp., *Monomorium floricola, Monomorium pharaonis, Pheidole megacephala, Pheidole* spp., *Solenopsis geminata; Solenopsis globularia; Solenopsis saevissima, Solenopsis* spp., *Wasmannia auropunctatadas*). Muitas destas espécies estão associadas aos domicílios no Brasil e são objetos de pesquisas para elucidar o seu papel como vetores de agentes patogênicos (MOREIRA et al., 2005; OLIVEIRA e CAMPOS-FARINHA, 2005; WETLER et al., 2005; COSTA, et al., 2006b; CINTRA, 2006; MAIA et al., 2009).

Levantamentos realizados nos últimos anos em hospitais de várias regiões do Brasil como em Santa Catarina (LISE et al., 2006), São Paulo (PEÇANHA, 2000; ZARZUELA et al., 2002; CINTRA, 2006), Minas Gerais (FREITAS e TEIXIERA, 2007; FONSECA et al., 2010; COSTA, et al., 2006a) e Goiás (PESQUERO et al., 2008; CARNEIRO et al., 2008), encontraram a presença de diferentes espécies de formigas atuando como vetores mecânicos, transportando bactérias, inclusive aquelas resistentes a antimicrobianos, possibilitando a dispersão de bactérias resistentes no ambiente externo e hospitalar (MOREIRA et al., 2005; FERRABOLI et al., 2007; RODOVALHO et al., 2007; PESQUERO et al., 2008). As bactérias transportadas pelas formigas incluíam as gram-negativas, aeróbias ou aeróbias facultativas e anaeróbias, muitas das quais são responsáveis por doenças do trato gastrointestinal e de outros órgãos, além do envolvimento com infecções nosocomiais (RODOVALHO et al., 2007).

Dados de uma pesquisa realizada no Hospital Central da Santa Casa de São Paulo revelaram que na análise de 50 formigas coletadas, foram isoladas bactérias causadoras de infecções hospitalares em 90% delas, dentre as quais: *Bacillus subtilis,*

Citrobacter, Enterobacter, Proteus e Serratia. (MIMICA et al., 1984). Outros estudos demonstraram que as formigas das espécies *P. longicornis, Solenopsis* spp e *Camponotos* spp são frequentemente encontradas em ambientes hospitalares, sendo consideradas vetores mecânicos em potencial de bactérias patogênicas como: Clostrídios, *Salmonellas, Klebsiellas,* Enterobactérias (BUENO e CAMPOS-FARINHA, 1998; FOWLER et al., 1993; SANTOS et al., 2009; ZARZUELA et al., 2002).

Análises realizadas no hospital universitário da Universidade de Taubaté - SP, em 2005, encontraram crescimento positivo para microrganismos em 98,4% das amostras de formigas coletadas, corroborando para a possibilidade destas serem consideradas vetores mecânicos de patógenos (PEREIRA e UENO, 2008), assim como os dados apresentados por outros pesquisadores em suas investigações (PEÇANHA, 2000; ZARZUELA et al., 2002; MOREIRA et al., 2005; LISE et al., 2006; COSTA, et al., 2006b; FERRABOLI et al., 2007; FREITAS e TEIXIERA, 2007; RODOVALHO et al., 2007).

Apesar dos inúmeros esforços realizados para o controle e erradicação de formigas em hospitais, poucos são os métodos efetivamente eficazes: alguns destes podem, quando equivocados, contribuir para a fragmentação das colônias e aumento da população e, na maioria das vezes, resultam em medidas temporárias. O controle é prejudicado pelas características das espécies como: a dificuldade na localização dos ninhos, a ocorrência de muitos ninhos, a reinfestação constante, a fragmentação das colônias, implicando em uma tarefa extremamente complexa. (BUENO e CAMPOS FARINHA, 1999; ZARZUELA et al., 2002; MOREIRA et al., 2005; GUERRA e CONCEIÇÃO, 2010).

Outro fato importante, por isso digno de ser ressaltado, é que a presença de formigas no ambiente hospitalar não é necessariamente um indicador de falta de higiene, já que algumas espécies são atraídas por materiais esterilizados, sendo consideradas bioindicadores de limpeza pela preferência por locais extremamente higienizados, mas não descartando a possibilidade de conterem microrganismos (BUENO e CAMPOS-FARINHA, 1999; MAIA et al., 2009).

Cerca de 1 a 2 % das infecções hospitalares poderiam ser atribuídas à presença de formigas. A presença destes artrópodes em unidades hospitalares representa um risco similar à de outros fômites potenciais para o transporte de bactérias, através de médicos e enfermeiros (FOWLER et al., 1995; GUERRA e CONCEIÇÃO, 2010).

Além das bactérias patogênicas relatadas, frequentemente transportadas por formigas, outra bactéria de importância mundial, responsável pela tuberculose, o *Mycobacterium tuberculosis*, foi isolada recentemente em formigas que infestavam as dependências do Instituto Clemente Ferreira, órgão de referência terciária no diagnóstico e tratamento da tuberculose e da tuberculose multidrogarresistente, pertencente à Secretaria de Estado da Saúde (ROXO et al., 2010).

A infestação estava disseminada por todas as áreas, entre elas, o laboratório de isolamento e identificação do bacilo. Após coleta destas formigas, foram realizados procedimentos de isolamento e identificação das micobactérias no Laboratório de Tuberculose do Centro de Sanidade Animal do Instituto Biológico, que constataram a presença da espécie *M. tuberculosis*, pertencente ao Complexo *M. tuberculosis*, confirmada por PCR, em uma formiga da espécie *Paratrechina longicornis*. Além deste isolamento, o próprio laboratório de Tuberculose animal do

Instituto Biológico enfrentava infestação semelhante, obtendo isolamento e identificação de duas micobactérias ambientais (*M. fortuitum-peregrinum e M. smegmatis*) em formigas da mesma espécie (ROXO et al., 2010).

O interesse de pesquisadores no assunto reflete a preocupação do risco potencial para a saúde pública, que a disseminação destes animais pode provocar, principalmente nos ambientes hospitalares.

A tuberculose é em sua essência uma “epidemia lenta” e, apesar da evolução do conhecimento na área da saúde pública e dos novos métodos de diagnóstico disponíveis, ainda é responsável pelo maior índice de mortalidade humana causada por um único agente infeccioso. Em 1993, foi declarada pela Organização Mundial de Saúde como “emergência global”, representando 26% das mortes previsíveis e 7% de todas as mortes no mundo. A estimativa para o ano de 2020 indica que 54,7% dos óbitos de adultos por doenças infecciosas serão decorrentes da tuberculose nos países em desenvolvimento (RUGGIERO et al., 2007; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

As estimativas anuais relatam cerca de 8,8 milhões de casos novos da doença, e 1,1 milhões de morte. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo bacilo da tuberculose, 100 milhões de pessoas infectadas por ano, com 9,2 milhões de doentes a cada ano. Em todos os continentes existem relatos de casos de tuberculose multidrogarresistente, totalizando 500 mil casos por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

De todos os casos de tuberculose existentes no planeta, 22 países são responsáveis por 80% dos casos, e o Brasil ocupa a 17º posição. Ademais, o Brasil, em conjunto com o Peru, é responsável por 50% dos casos da doença nas Américas.

Segundo os dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde (Sinan), estima-se que no país, aproximadamente 63 milhões de pessoas estejam infectadas pelo bacilo da tuberculose. Sendo notificados 71 mil casos novos anualmente e 4.600 óbitos pela doença (correspondendo a um coeficiente de incidência de 37,7 casos novos por 100.000 habitantes) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Cerca de 70% dos casos concentram-se em 315 dos 5.570 municípios brasileiros, e os estados com maior incidência da doença são Amazonas (73,5 por 100.000), Rio de Janeiro (73,2 por 100.000) e Ceará (50,8 por 100.000). No estado de São Paulo são notificados 21.000 casos por ano, sendo que em 2004 foram notificados 17.000 casos novos de tuberculose, apresentando um coeficiente de incidência de 43,9 casos por 100.000 habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; GALESI, 2007; SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE, 2008).

A doença é provocada por bacilos aeróbios, imóveis, álcool-ácido resistentes, pertencentes à ordem *Actinomycetales*, família *Micobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium*, com mais de 150 espécies conhecidas. As principais espécies, de importância epidemiológica para o homem, estão agrupadas no Complexo *Mycobacterium tuberculosis*: *M. tuberculosis, M. bovis, M. microti, M. africanum* e *M. canetti* (BIER, 1978; CORNER, 1994; ABRAHÃO, 1998; BROSCH et al., 2002; RUGGIERO, 2004).

A principal forma de transmissão da tuberculose humana é a respiratória e ocorre quando um indivíduo com tuberculose pulmonar ativa, ao tossir, espirrar ou falar, elimina os bacilos no ar, que são aspirados por outro indivíduo e que podem permanecer viáveis no ambiente por várias horas. Outras formas de transmissão da

doença são relatadas como a via intra-uterina, por aspiração do líquido amniótico infectado antes do parto, ou pelo contato íntimo do lactente com a mãe infectada. A espécie *Mycobacterium bovis*, também causa tuberculose, e a principal via de transmissão é a digestiva, relacionada à ingestão de alimentos de origem animal, como leite não pasteurizado (RUGGIERO, 2004; MANUAL MERCK, 2009).

A tuberculose acomete diferentes populações no mundo. Nos países desenvolvidos, a doença ocorre principalmente em idosos, minorias étnicas e imigrantes. Em países em desenvolvimento, a população economicamente ativa entre 15 e 54 anos, indivíduos privados de liberdade, moradores de rua, e as pessoas de menor nível social e cultural são os mais suscetíveis (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Apesar da preocupação mundial com o número de casos de tuberculose, o risco de infecção nosocomial entre os profissionais de saúde e pacientes internados é maior que na população em geral, com alto risco de surtos nestes ambientes. Estudos revelaram que a prevalência de tuberculose nestes indivíduos é duas a quatro vezes maior que da população em geral; com um agravante, o risco de disseminação de formas multirresistentes (GONÇALVES, 2001; FRANCO e ZANETTA, 2004; FIGUEIREDO e CALIARI, 2006; COSTA, et al., 2006a).

Um fator agravante refere-se à associação da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida com *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente (TB-MDR) representando uma ameaça potencial para a Saúde Pública, principalmente nos países com alta incidência de tuberculose e progressão da epidemia por HIV (PORTUGAL, 2002).

A transmissão nosocomial da tuberculose ganhou novas dimensões nos últimos anos, devido à associação com o vírus HIV, ao uso de esquemas terapêuticos diversificados e ao aparecimento de cepas multidrogarresistentes aos quimioterápicos utilizados no tratamento. O risco de transmissão das micobactérias em ambiente hospitalar varia em função das características da instituição, da prevalência local da doença e da eficácia dos programas de controle da infecção (LEVIN et al., 2006).

Além das micobactérias pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* existem as denominadas micobactérias ambientais, também conhecidas como micobactérias atípicas ou micobactérias não tuberculosas (MNT). Na literatura, considera-se que estas micobactérias são ambientais, de patogenicidade variável, e amplamente distribuídas na natureza, presentes na água, no solo, na vegetação, e também isoladas de mosquitos, moscas, baratas e também de formigas. Estas espécies têm despertado grande preocupação, principalmente porque algumas delas podem ser resistentes a antibióticos, desinfetantes e microbicidas (FONTANA, 2008).

As micobactérias denominadas potencialmente patogênicas são responsáveis por inúmeras doenças nos homens e nos animais, apresentando diversos graus de severidade e de importância para a saúde pública. As micobactérias de crescimento lento, pertencentes ao Complexo MAIS (*M. avium, M. intracellulare e M. scrofulaceum*) são encontradas principalmente em indivíduos imunodeprimidos e em portadores de HIV, apresentando doenças disseminadas e com maior gravidade (FISHER et al., 2001; FISHER et al., 2003; PAI et al., 2003; ROXO et al., 2003; SECRETARIA ESTADUAL DE SAUDE, 2005; FONTANA, 2008). Já as de crescimento rápido estão associadas a infecções pós-traumáticas e neste grupo

encontram-se as espécies do complexo *M. fortuitum* (*M. fortuitum, M. peregrinum* e variantes de *M. fortuitum*: *M. houstonense, M. bonickei, M. septicum, M. mageritense, M. mucogenicum* e *M. senegalense*); micobactérias do complexo *M. chelonae-abscessus* (*M. chelonae, M. abscessus, M. bolletii, M. immunogenum*, *M. massiliense)*; e aquelas que compõem o complexo *M. smegmatis* (*M. smegmatis, M. goodii* e *M. wolinski*). E as espécies que não pertencem a complexos: *M. aurum, M. elephantis, M. flavescens, M. gadium, M. gilvum, M. neoaurum, M. parafortuitum, M. phlei, M. phocaium, M. thermoresistible, M. vaccae* e outras (SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE, 2005; PITOMBO et al., 2009).

Nos últimos anos, a evolução das tecnologias, das drogas antimicrobianas e dos tratamentos permitiu grandes avanços da medicina nos prognósticos de doenças. Entretanto, estes aliados contribuíram para o surgimento de resistência bacteriana e de novas formas vivas de microrganismos, provocando desafios na execução de ações rotineiras pelos profissionais de saúde, relacionadas principalmente à prevenção de infecções hospitalares (FONTANA, 2008).

Na ultima década, o aumento de infecções nosocomiais ocasionadas pelas micobactérias ambientais alarmaram as entidades de saúde, embora relatos sobre o envolvimento de micobactérias de crescimento rápido nestes quadros sejam descritos desde 1950. Surtos oriundos destas micobactérias foram descritos em todo mundo (SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE, 2005; FONTANA, 2008; PITOMBO et al., 2009).

Inúmeros destes eventos resultam de falhas em processos de lavagem, esterilização e desinfecção de equipamentos, cooperando para a existência de condições adequadas para a proliferação destes patógenos. Equipamentos

empregados em acupuntura, procedimentos de hemodiálise, cateteres peritoneais, aplicação de piercing, cirurgias estéticas (lipoaspiração, próteses mamárias, mesoterapia, mastectomia), procedimentos videocirúrgicos (artroscopia, broncoscopias, vídeolaparoscopias, endoscopias, colecistectomia, histerectomia, ooforoplastia, entre outros), cirurgias oftálmicas, foram citados como foco de infecção das micobactérias ambientais (SECRETARIA ESTADUAL DE SAUDE, 2005; PITOMBO et al., 2009).

A contaminação dos sistemas de água em hospitais por micobactérias é descrita há muitos anos. Algumas espécies de micobactérias são capazes de colonizar tanto sistemas de tubulação de água fria quanto de água quente, facilitando a contaminação de fômites. Em 1997, Hunter identificou oito espécies de micobactérias *(M. fortuitum, M. gordonae, M. marinum, M. scrofulaceum, M. terrae, M. ulcerans, Complexo M. avium e M. xenopi*) associadas à transmissão de enfermidades ao homem pela água. A presença destes patógenos em biofilmes produzidos no fundo dos recipientes de soluções degermantes e desinfetantes também foram identificadas em surtos da doença (FONTANA, 2008; LORENA et al., 2009; PITOMBO et al., 2009).

A maioria dos casos notificados no Brasil e no mundo vinculados às MNT foram atribuídos à difusão de procedimentos invasivos como: lipoaspiração, mesoterapia e vídeolaparoscopias. Embora estas micobactérias não suscitem altos índices de mortalidade, é sabido que têm um significativo impacto na saúde publica, exigindo ações efetivas para a prevenção das mesmas (SECRETARIA ESTADUAL DE SAUDE, 2007; FONTANA, 2008; PITOMBO et al., 2009).

No mundo, entre os inúmeros relatos de surtos pelas MNT, podemos citar: o isolamento da espécie *M. chelonae,* subespécie *abscessus* em 86 pacientes após injeção de penicilina em um hospital chinês entre 1997 a 1998; na Venezuela durante 2002 e 2003 e no Peru entre 2004 e 2005, após sessões de mesoterapia; República Dominicana, após cirurgias plásticas; no Canadá em 2006, em pacientes tratados com acupuntura e na Espanha, onde um levantamento realizado de 1982 a 2003, identificou 341 pacientes com históricos de micobacterioses (ZHIBANG et al., 2002; FONTANA, 2008; MUNAYCO et al., 2008; PITOMBO et al., 2009).

No Brasil, desde 2005, surtos com o envolvimento das espécies *M. abscessus, M. chelonae* e *M. fortuitum-peregrinum* foram notificados nos estados de São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Alagoas, Goiás, Minas Gerais, Pará, Espírito Santo e Rio de Janeiro. De 2003 a 2008, 2102 notificações por infecções com micobactérias de crescimento rápido distribuídos predominantemente em hospitais privados foram constatadas. Determinando um problema epidemiológico emergente (SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE, 2008; ANVISA, 2008; DUARTE et al, 2009; LEÃO et al., 2009; LEÃO et al., 2010; PITOMBO, 2009).

Os surtos de micobacterioses de maior relevância no país ocorreram em: Campinas, São Paulo, nos anos de 2003 e 2004, com a identificação de 33 pacientes em 4 hospitais, submetidos a mastoplastia de aumento; no ano de 2004 em Belém, Pará, 310 pessoas foram diagnosticadas após mesoterapia e vídeolaparoscopias realizadas em dezesseis unidades de saúde diferentes; na região metropolitana do estado do Rio de Janeiro em 2006, 699 notificações em 56 hospitais das cidades de Duque de Caxias, Nilópolis, Niterói, Nova Iguaçu e 593 destas notificações eram provenientes da cidade do Rio de Janeiro; e, por último, no Espírito Santo, em 2007

foram 248 casos notificados (PITOMBO et al., 2009; MACEDO et al., 2009, ANVISA, 2011).

As avaliações dos surtos de 1998 a 2009, no nosso país revelaram uma epidemia de grandes proporções concentrada em 10 estados, associada procedimentos de vídeolaparoscopias, com uma espécie predominante de micobactéria, sugerindo a presença de uma fonte única, podendo ser vinculada a equipamentos, produtos de insumos, ou desinfetantes. Entre as hipóteses elencadas para esta situação encontram-se: modificações ecológicas na epidemiologia das infecções em locais de assistência a saúde (fato considerado natural e de caráter evolutivo); melhoria nos métodos e nos laboratórios de diagnóstico do país; aumento das notificações, principalmente após os surtos de 2005 a 2007; produção crescente de biofilmes devido ao reprocessamento de materiais; e a vasta disseminação de novas técnicas de saúde, ligadas aos procedimentos cosméticos (ANVISA, 2011).

Um surto recente foi descrito no Brasil, em 2009, relacionado à micobactérias de crescimento rápido e provocado após procedimentos de vacinação (MATSUMOTO et al., 2009).

Neste surto ocorrido após vacinação para diferentes finalidades em um posto de saúde da cidade de Andradina, interior de São Paulo, em 2009, 52 indivíduos foram infectados. A cepa *M. abscessus subespécie abscessus* foi identificada como responsável. Apesar de não ter sido determinada a fonte de infecção, avaliações da água do local isolaram outras micobactérias de crescimento rápido como: *M. fortuitum, M. smegmatis* e *M. gordonae* (MATSUMOTO et al., 2009).

O aumento do interesse dos laboratórios de micobacteriologia, principalmente pela introdução de novos métodos laboratoriais, em identificar as micobactérias,

permitiram correlacionar aspectos clínicos e epidemiológicos, possibilitando aprofundar os conhecimentos sobre as enfermidades causadas por estas espécies, delinear surtos e determinar fontes de infecções (BARRETO e CAMPOS, 2000; MACEDO e HENRIQUES, 2009).

O diagnóstico das micobactérias patogênicas e de crescimento rápido é definido pelo isolamento e identificação do agente e por provas bioquímicas para definição de espécie. Para as MCR, entre as provas bioquímicas incluem-se: prova da redução de nitrato, catalase, hidrólise do Tween, urease, arilsulfatase, absorção de ferro, e utilização dos carboidratos manitol, inositol e citrato, além de testes adicionais não moleculares (BROWN-ELLIOT e WALLACE, 2002).

O avanço das técnicas de biologia molecular, entre elas a PCR (*Polymerase Chain Reaction*), o Spoligotyping e o RFLP (*Restriction Fragment Lenght Polymorphism*) permitiram identificar a transmissão da tuberculose entre os profissionais de saúde, por meio da caracterização das cepas envolvidas, além de determinar, com um elevado grau de certeza, as fontes da infecção em microepidemias hospitalares e confirmar casos de reinfecção (GONÇALVES, 2001; FRANCO e ZANETTA, 2004).

A identificação de espécies de micobactérias de crescimento rápido, principalmente em amostras clínicas se faz útil por indicar a suscetibilidade a antibióticos. Em muitos laboratórios, o procedimento de identificação das espécies é realizado por provas fenotípicas e que são extremamente trabalhosos e demorados, além de fornecer resultados inconclusivos ou mesmo ambíguos. Exemplificando: o fato de não serem capazes de diferenciar espécies intimamente relacionadas como *M. chelonae* de *M. abscessus*. Além disso, muitas espécies ainda não fazem parte de

banco de dados, devido a sua recente associação a agentes de doença. Outros métodos como o HPLC (High Performance Liquid Cromatography - cromatografia líquida de alta performance), que analisa os padrões extraídos das cadeias longas de ácidos graxos (ácidos micólicos) presentes na parede celular das micobactérias, são empregados como rotina para a identificação de MNT em muitos laboratórios de referência. Para o êxito na identificação, é necessário que as condições de crescimento das culturas sejam padronizadas, o que nem sempre é obtido, acarretando em alterações nos picos dos padrões de ácidos micólicos, dificultando a identificação. Estudos recentes indicam que o HPLC não identifica precisamente as espécies, e desaconselha seu uso como único método de identificação, sendo mais adequado seu emprego em conjunto com outras tecnologias (BROWN-ELLIOT e WALLACE, 2002; ADEKAMBI et al., 2003).

Estudos relativos a identificação de espécies de micobactérias empregando o sequenciamento de genes como o *hsp* 65, 16S rDNA e região do espaçador interno *ITS* são freqüentes, além de análises não comerciais (*in house*) aplicando técnica de PRA com diferentes genes codificantes como *hsp*65 (TELENTI et al., 1993), *rpoB* (LEE et al., 2000), *dnaJ* (TAKEWAKI et al.., 1994), *recA* (BLACKWOOD et al., 2000), tuf (SHIN et al., 2009) e transcrição interna do espaçador 16S-23S (KHAN et al., 2005; ROTH et al., 1998), mas o limitado número de espécies de MNT depositado nos banco de dados restringe a aplicação destas metodologias na rotina de identificação nos laboratórios de referências (BROWN-ELLIOT e WALLACE, 2002; ADEKAMBI et al., 2003; COSTA et al., 2010a).

Entretanto, o método molecular mais difundido mundialmente para a identificação de espécies de MNT consiste na PCR com análise de restrição (PRA)

de um fragmento de 439 pares de base, também conhecido com fragmento de Telenti, a partir da codificação do gene de uma proteína de choque térmico (65kDa). Entre as suas vantagens, citam-se: a simplicidade, o custo efetivo, por não envolver radioisótopos e pela grande variedade de espécies de micobactérias que pode identificar (TELENTI et al., 1993; BROWN e ELLIOT, 2002; LEÃO et al., 2005; CHIMARA et al., 2008;COSTA et al., 2010a).

O método versa na habilidade de enzimas de restrição (*Bste*II e *Hae*III) em cortar o DNA em fragmentos com determinadas sequências de bases. Estes fragmentos de diferentes tamanhos são separados de acordo com o peso molecular, pelo emprego de eletroforese em ágar gel de alta resolução. A interpretação destes fragmentos é feita por uma avaliação visual que compara as bandas formadas aos marcadores de peso molecular e, posteriormente, os valores apresentados são interpretados usando algoritmos publicados em um site da internet específico para esta análise, o PRASITE (http://app.chuv.ch/prasite/index.html) (TELENTI et al., 1993; ABRAHÃO, 1998; LEÃO et al., 1999; BUM-JOM et al., 2001; PALOMINO et al., 2002; COSTA et al., 2010a).

Em alguns casos o método PRA não é capaz de determinar com clareza a espécie de micobactéria. Muitas pesquisas empregam o sequenciamento genético com diferentes alvos para auxiliar a identificação. Esta metodologia possibilita a confirmação dos resultados obtidos no PRA e a identificação de novas espécies. Os alvos genéticos empregados frequentemente são: *16S*, *rpo*B e *hsp65* (BROWN-ELLIOT e WALLACE, 2002; ADEKAMBI et al., 2003; COSTA et al., 2010a).

Cada alvo apresenta vantagens e desvantagens. O gene 16S é empregado há mais de 10 anos, sendo responsável pela descrição de 45 novas espécies. O método é

considerado padrão ouro na identificação de micobactérias emergentes como não usuais e por ser amplamente difundido. Mas, para a descrição de novas espécies, seu emprego é discutido, principalmente pela possibilidade de haver duas cópias do mesmo gene na mesma espécie e também pela dificuldade em distinguir espécies intimamente relacionadas, sendo empregado para auxiliar a estabelecer grupos taxonômicos (COOK et al., 2003; ADEKAMBI et al., 2006, da COSTA et al., 2010a).

O gene *hsp65* está presente em todas as micobactérias, sendo altamente conservado, mas com maior variabilidade que o gene 16S *rRna*, e, portanto, mais útil na identificação de espécies geneticamente relacionadas. Por isso, é amplamente empregado para estudos taxonômicos e na construção de banco de dados abrangente (TELENTI *et al*., 1993, RINGUET *et al*., 1999; MCNABB *et al*., 2004; BRITO, 2008).

O gene *rpoB* codifica uma única cópia da subunidade b do Rna polimerase bacteriano. Inicialmente, foi usado na identificação molecular de bactérias entéricas, riquétsias, espiroquetas, *Staphylococcus* sp. Para micobactérias, o sequenciamento parcial do gene apresentou resultados relevantes na identificação de espécies de MNT, auxiliando na diferenciação de espécies como: *M. abscessus* de *M. boletti* e de *M. massiliense*, tornando-se vantajoso para a determinação taxonômica deste grupo (BROWN-ELLIOT E WALLACE, 2002; ADEKAMBI *et al*., 2003; ADEKAMBI *et al*., 2006; BRITO, 2008; COSTA et al. , 2010a).

Pesquisas realizadas comprovaram a importância das formigas como vetores de agentes patogênicos, entre eles, espécies de micobactérias relevantes para a Saúde Pública. Estudos com o gênero *Mycobacterium* auxiliariam a elucidar a função destes

artrópodes como vetores e disseminadores potenciais das micobactérias em ambientes hospitalares, permitindo o auxílio na adoção de medidas de controle e erradicação eficazes destes insetos, minimizando os prejuízos ocasionados pelos mesmos.

Este projeto visa demonstrar o potencial das formigas como vetores mecânicos de micobactérias em hospital especializado no atendimento de doentes de tuberculose.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial das formigas como vetores mecânicos de micobactérias em um hospital especializado em tuberculose localizado no estado de São Paulo.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a presença e determinar a espécie de formigas encontradas em um determinado ambiente hospitalar.

-Verificar a contaminação de formigas com espécies de micobactérias, coletadas em hospital especializado em tratamento de tuberculose.

-Identificar as espécies de micobactérias isoladas a partir de formigas através de métodos de biologia molecular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

A população de estudo desta pesquisa foram as formigas encontradas no hospital selecionado.

3.2 LOCAL DA COLETA

Para a realização desta pesquisa foram avaliados, dentro da rede de atendimento hospitalar pertencente à Secretaria Estadual de Saúde de São Paulo, hospitais que mantivessem como características: o atendimento e internação de pacientes com tuberculose, e que sua localização favorecesse a presença de formigas.

3.2.1 Hospital selecionado

A escolha do hospital ocorreu após a avaliação entre os hospitais vinculados a Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo com fatores favoráveis à presença e disseminação de formigas no ambiente, como: áreas verdes ao redor do hospital e de fácil acesso, e a proximidade de residências.

3.2.2 Histórico do hospital selecionado

O hospital selecionado (identificado como Hospital) foi construído na década de 40 e iniciou o seu funcionamento em 1958 para ser um sanatório para tuberculose, com capacidade operacional de 672 leitos, atendendo as determinações da legislação vigente que preconizava a internação compulsória de doentes portadores de tuberculose. A partir de 1980, com a alteração da política de atendimento para estes pacientes, substituindo-se a hospitalização compulsória pelo atendimento

ambulatorial, ficando a hospitalização para casos graves e casos sociais, o hospital teve seu número de leitos diminuídos progressivamente.

A necessidade de possibilitar um melhor aproveitamento de suas instalações, funcionários e equipamentos, esta unidade passou a ser um “hospital geral”, com enfâse em doenças infecciosas.

A unidade de saúde escolhida, quando criada, seguia os preceitos vigentes na década de 50 do século XX para o tratamento da tuberculose, mantendo os doentes em locais com boa qualidade de ar e isolados da aglomeração urbana, preceitos preenchidos por este hospital situado em uma área rural de uma cidade no interior do estado de São Paulo, longe de grandes centros urbanos.

Com o desenvolvimento urbano e o crescimento das cidades, esta Unidade de Saúde, que inicialmente encontrava-se distante do centro urbano, passou a integrá-lo. Atualmente, a instituição faz parte da área urbana da cidade, entretanto, mantém como característica a presença de extensas áreas verdes margeando suas edificações, das quais podem usufruir os pacientes internados.

O Hospital encontra-se situado a 280 km de São Paulo, numa área de 19 alqueires e 58.000 m^2.

3.2.3 Características atuais do atendimento neste Hospital

O hospital selecionado, no período da realização da coleta, dispunha de 108 leitos operacionais, sendo 56 para Tisiologia, 12 leitos para AIDS e 40 leitos para pacientes tuberculosos crônicos, sendo referência para as diretorias regionais de saúde de Araraquara, Franca, Barretos, Ribeirão Preto e São João da Boa Vista, e, quando necessário, atende também as cidades de Araçatuba, Presidente Prudente,

São José do Rio Preto, Bauru, Marília, Assis, Sorocaba, Botucatu e Piracicaba (SEVERO *et al.*, 2007).

Entre 1994 a 2004, foram internados no hospital 1797 pacientes para o tratamento de tuberculose (SEVERO et al., 2007). Os dados de pacientes internados na instituição durante a realização desta pesquisa foram de 165 pacientes, internados entre janeiro de 2010 a janeiro de 2011, perfazendo uma média mensal de 13,75 pacientes.

Os pacientes internados, segundo as pesquisas realizadas entre 1994 a 2004 (SEVERO et al., 2007) e entre 2000 a 2005 (CALIARI e FIGUEIREDO, 2007), eram em sua maioria do sexo masculino, representando no primeiro estudo 93% e no segundo 83,2% do total de pacientes internados, com idade média de 42 anos e provenientes de diversas regiões do Estado de São Paulo. Quanto à forma clínica, as duas pesquisas relatam dados similares, com mais de 90% dos casos apresentando a forma pulmonar da doença. Os principais motivos da internação ocorreram primeiramente por intolerância medicamentosa, seguida de causas sociais e, por último, a falta de adesão ao tratamento (CALIARI e FIGUEIREDO, 2007; SEVERO *et al.*, 2007).

3.2.4 Características físicas do Hospital

O prédio original do hospital selecionado apresenta o mesmo estilo arquitetônico encontrado em outros hospitais do interior do Estado de São Paulo, construídos nas décadas de 40 e 50 do século passado com a finalidade de internação de pacientes com tuberculose.

Atualmente, este é um dos hospitais que internam pacientes com tuberculose, entre os 18 hospitais do estado para pacientes crônicos.

Possui uma área total construída de 54 mil metros quadrados, em forma de H, sendo divididos em 11 blocos, de dois e três pavimentos.

O hospital selecionado foi visitado em meados de 2007 e observado que as estruturas da edificação encontravam-se extremamente deterioradas, sendo informado na ocasião que uma reforma geral estava prevista.

No ano de 2008, a reforma foi iniciada pela Secretária Estadual de Saúde do Estado de São Paulo e concluída no inicio de 2009. Esta reforma reparou toda a estrutura física e das instalações do hospital e foram construídos espaços para serviços de apoio, um abrigo para os médicos residentes e equipes de plantão, além de dependências de ensino e de pesquisa.

A área destinada aos pacientes portadores de tuberculose e Aids encontra-se separada dos demais anexos, sendo composta por um bloco de 3 pavimentos e com porta de entrada independente dos demais blocos.

No primeiro pavimento deste bloco estão instalados os setores administrativos, vestiários dos funcionários, almoxarifado, laboratórios de diagnóstico, salas de terapia ocupacional e refeitórios para os funcionários.

No segundo pavimento estão localizadas as alas de internação masculina e feminina para os pacientes em tratamento para tuberculose. Estas alas são compostas de:

- sala multiuso com televisão;

- saleta para preparo e armazenamento dos medicamentos;

- copa para os funcionários;

- solarium: (área livre coberta, sem a presença de janelas ou qualquer outro elemento que impossibilite o contato da área externa com a área interna, com acesso aos quartos e com livre acesso dos pacientes);

- quartos com acesso ao solarium;

- quartos sem acesso ao solarium;

- um banheiro para cada dois quartos.

No terceiro pavimento estão internados os pacientes com tuberculose multidrogarresistente. Neste pavimento, o acesso de funcionários e visitantes é restrito e monitorado.

3.3 TÉCNICA DE COLETA DAS FORMIGAS

As formigas foram coletadas em diferentes pontos do bloco hospitalar responsável pela assistência de doentes de tuberculose, citados abaixo:

- entrada principal do hospital,

- portas de acesso ao hospital,

- corredores de acesso às alas dos pacientes,

- cozinha,

- refeitórios (funcionários e pacientes),

- quartos dos pacientes,

- banheiros dos pacientes,

- “solarium” dos pacientes,

- sala multiuso dos pacientes,

- e dependências onde foi verificada a presença das formigas.

As coletas foram realizadas entre os anos de 2009 e 2010, principalmente nas estações mais quentes do ano (primavera e verão).

3.4 MÉTODO DE COLETA

Para as coletas das formigas foram empregados criotubos de polipropileno, esterilizados e com tampa de rosca de diferentes tamanhos. Um criotubo de 5 cm de comprimento, designado de microtubo A; e outro de 8 cm de comprimento, designado de microtubo B.

Os procedimentos para as coletas foram o de busca ativa com coleta manual e o emprego de iscas atrativas.

As coletas foram realizadas entre os anos de 2009 e 2010, e pelo menos dois exemplares de formigas foram coletados de cada local. Um exemplar destinado aos procedimentos laboratoriais para isolamento e identificação de micobactérias e outro exemplar para a identificação do gênero e espécie da formiga coletada.

3.4.1 Método de coleta manual

Neste procedimento metodológico foram utilizados dois mecanismos de coleta dos exemplares de formigas: a coleta em que o microtubo foi emborcado diretamente sobre a formiga, e o outro com o auxílio de um pincel de cerdas macias embebido em álcool a 70%.

3.4.1.1 Diretamente sobre a formiga

Nas coletas destinadas aos procedimentos laboratoriais, a coleta manual foi executada emborcando-se o microtubo A estéril, sobre cada exemplar de formiga encontrado.

Depois da captura, o microtubo foi fechado com tampa de rosca e o material armazenado em freezer a -18°C até o seu processamento. Este procedimento foi realizado em todas as coletas.

3.4.1.2 Método de coleta com pincel

Os exemplares de formigas destinados à identificação de gênero e espécie foram coletados com auxílio de um pincel de cerdas macias embebidas em solução alcoólica a 70%. As formigas aderidas às cerdas do pincel foram submersas no microtubo A estéril, contendo álcool a 70%, posteriormente fechados com tampa de rosca e armazenados em temperatura ambiente até o seu envio ao Laboratório de Referência em Pragas Urbanas do Instituto Biológico, responsável por esta identificação.

3.4.2 Método de coleta com isca atrativa

Com o objetivo de atrair um maior número de formigas, as iscas atrativas foram utilizadas.

A isca atrativa inicialmente usada consistia de uma gota de mel colocada num pedaço de papel com cola especifica para roedores, distribuídos nos quartos dos pacientes por 24 horas. Como este método não se mostrou eficaz, empregou-se uma mistura alimentar composta por fígado bovino desidratado, bolo de abacaxi industrializado e mel (BUENO e CAMPOS-FARINHA, 1999). Este preparado era inserido dentro de tubos plásticos, medindo aproximadamente 20 mm de comprimento e 5 mm de diâmetro, com as extremidades livres. Os tubos repletos da mistura foram colocados nos microtubos B, que permaneciam abertos no local da coleta possibilitando a entrada de formigas.

Este material foi distribuído em diferentes pontos do hospital, no horário compreendido entre o final da manhã e o início da tarde (das 11h às 16 h). A escolha deste período justifica-se porque, segundo os especialistas em artrópodes, é considerado o de maior atividade destes animais.

Decorridos pelo menos 20 minutos da distribuição das iscas, estas eram verificadas, e naquelas em que havia a constatação de formigas, realizavam-se as coletas.

Durante as coletas, observou-se o comportamento adotado pelas formigas. Nas ocasiões em que as formigas foram detectadas no interior do microtubo B contendo a isca, este microtubo foi fechado com a tampa de rosca, permanecendo no microtubo as formigas coletadas e a isca atrativa. Para aquelas iscas onde as formigas

foram detectadas próximas ao microtubo B, a coleta realizada foi manual utilizando-se o microtubo A que posteriormente foi fechado com tampa de rosca.

Todos os exemplares coletados pelo método de isca atrativa também foram armazenados em freezer a -18°C até o seu processamento.

3.4.3 Identificação dos microtubos contendo formigas

Os microtubos A e B empregados durante a coleta das formigas foram identificados de acordo com o local no qual os animais foram encontrados no hospital. Para isto, estes microtubos receberam uma etiqueta com uma sequência numérica crescente e relacionada ao local da sua coleta, anotados em uma planilha (Anexo 1).

3.5 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE FORMIGAS

As formigas coletadas no hospital designadas para a identificação de espécie foram armazenadas, como já descrito, em microtubo A contendo álcool a 70% e encaminhadas à Unidade Laboratorial de Referência em Pragas Urbanas do Instituto Biológico, onde foram identificados segundo gênero e espécie.

Cada exemplar coletado recebeu uma etiqueta com um número correspondente ao local da coleta. Estes exemplares foram identificados utilizando-se as chaves de Bolton (1994) e por comparação com exemplares depositados na Coleção Entomológica Adolph Hempel, do Instituto Biológico.

3.6 ISOLAMENTOS DE MICOBACTÉRIAS ORIUNDAS DAS FORMIGAS COLETADAS NO HOSPITAL

As formigas coletadas em microtubo A e microtubo B pelos métodos de busca ativa e por isca atrativa foram processadas com o intuito de avaliar a presença de micobactérias através do isolamento destas em meios de cultura específicos.

3.6.1 Meios de cultura para isolamento e identificação de micobactérias

Para o isolamento de micobactérias foram empregados dois tipos de meio de cultura:

- Löwestein-Jensen (LJ): sendo este um meio solidificado à base de ovo, contendo glicerol e asparagina, consideradas fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, o que permite o crescimento da maioria das micobactérias de interesse médico.

-Stonebrink: isento de glicerina e contendo piruvato de sódio como fonte de carbono, foi empregado para o isolamento de *Mycobacterium bovis.*

3.6.2 Processamento dos exemplares de formiga para o isolamento de micobactérias em meios de cultura.

As formigas coletadas foram submetidas aos métodos de isolamento para micobactérias preconizados pelo Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005) e realizados no Laboratório de Tuberculose do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico.

Estes exemplares de formigas foram congelados um período mínimo de 24 horas e processados em fluxo laminar, em um laboratório de nível de segurança biológica para tuberculose, segundo as normas do CDC (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Todos os materiais empregados no processo de isolamento e identificação eram estéreis.

Cada exemplar de formiga coletado no microtubo A foi macerado no fundo do próprio microtubo, com o auxílio de uma ponteira estéril e descartável.

As formigas coletadas com o microtubo B foram retiradas e colocadas individualmente em um novo microtubo A estéril. A numeração descrita no microtubo B foi repetida no novo recipiente para cada exemplar retirado. Na planilha do local da coleta, o número que correspondia à isca recebia a informação sobre o número total de formigas coletadas por aquela isca. Só então, estes exemplares de formigas foram submetidos ao processo de maceração, realizado como já descrito.

Em seguida, o material macerado foi suspenso em aproximadamente 2 ml de salina fisiológica estéril, submetido à agitação no aparelho Vortex AP56 (Phoenix, USA) por 30 segundos e semeado em quatro tubos de meio de cultura, sendo dois tubos do meio Stonebrink e 2 tubos de Löwestein-Jensen.

Os tubos semeados foram identificados com a letra F maiúscula seguida de um ponto final e o número correspondente à identificação da coleta da formiga. Esta identificação foi adotada também nos métodos moleculares, conforme o exemplo abaixo:

- F.183

Cada tubo foi semeado com aproximadamente 0,5 ml da suspensão da amostra, correspondendo a cinco ou seis gotas de Pipeta Pasteur e incubados em estufa a 37°C por até 90 dias.

3.6.3. Leitura dos meios de cultura

Foi desenvolvida uma planilha para o registro semanal do resultado da leitura de cada formiga processada e semeada em meio de cultura. A cada leitura eram avaliados os quatro tubos semeados para cada exemplar de formiga coletada (Anexo 2).

Nestas leituras foram verificados:

A) a presença de crescimento suspeito de micobactéria.

Todo material que apresentava crescimento suspeito foi submetido:

- a confecção de uma lâmina para execução da coloração de Ziehl-Neelsen com a finalidade de identificar os bacilos álcool-ácido resistentes, que são característicos do gênero;

- a um novo repique em meio de cultura Löwestein-Jensen;

- a coleta de colônias para realização de métodos moleculares.

B) a presença de crescimento suspeito com contaminação.

Culturas com crescimento suspeito e presença de fungos em áreas restritas do meio de cultura eram:

- mantidas em estufas e reavaliadas semanalmente,

- submetidas à confecção de uma lâmina para execução da coloração de Ziehl-Neelsen com a finalidade de identificar os bacilos álcool-ácido resistentes, que são característicos do gênero;

- realizado um novo repique em meio de cultura Löwestein-Jensen;

- e coletadas colônias para realização de métodos moleculares.

Culturas com crescimento suspeito e com contaminação mais acentuada de microrganismos foram submetidas:

- à confecção de uma lâmina para execução da coloração de Ziehl-Neelsen com a finalidade de identificar os bacilos álcool-ácido resistentes, que são característicos do gênero;

- ao método de descontaminação por Petroff (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005);

- semeados em novos meios de cultura Löwestein-Jensen.

Os cultivos, que mesmo após a execução dos métodos de descontaminação, apresentaram crescimento apenas de colônias suspeitas, foram submetidos aos mesmos procedimentos adotados para material com crescimento suspeito.

C) Contaminação maciça de fungos e de outras bactérias.

As culturas excessivamente contaminadas foram descartadas.

3.6.4 Colorações utilizadas na identificação das micobactérias

Para a identificação das colônias isoladas nas culturas foram preparados esfregaços a partir de uma alça da colônia suspeita. Estes esfregaços foram submetidos ao método de coloração de Ziehl-Neelsen, conforme preconizado pelo Manual de Bacteriologia da Tuberculose, desenvolvido pelo Ministério da Saúde, para a identificação de bacilos álcool - ácido resistentes (BAAR). O fundamento desta técnica consiste na capacidade das micobactérias em reter a fucsina após coloração e não se deixar descorar pela ação do álcool-ácido, permitindo a visualização de bacilos vermelhos.

Em casos duvidosos, foi utilizada a coloração de Auramina O, que permite a visualização de bacilos amarelo brilhante em fundo escuro por microscopia fluorescente e também a coloração de Gram, capaz de diferenciar as bactérias Gram positivas das Gram negativas.

3.6.5 Identificação fenotípica de micobactérias

Em relação às características fenotípicas, foram avaliados: o tempo de crescimento e a produção de pigmentos.

Optou-se por não realizar outros métodos bioquímicos clássicos para a determinação das espécies, por sua complexidade, pela possibilidade de resultados inconclusivos e a presença de culturas contaminadas.

3.6.5.1 Avaliação do tempo de crescimento

O crescimento é definido como o tempo necessário para que as colônias possam ser visualizadas a olho nu, em meio sólido.

As micobactérias foram classificadas conforme o tempo de crescimento:

- micobactérias de crescimento rápido, com tempo de visualização das colônias menor que sete dias;

- micobactérias de crescimento lento, com tempo de visualização das colônias maior que sete dias.

3.6.5.2 Avaliação da produção de pigmento das culturas isoladas.

Para avaliação da produção de pigmentos pelas micobactérias isoladas foram executados repiques da cultura com crescimento em dois tubos de meio de cultura de Löwestein-Jensen, que foram cobertos com papel alumínio, quando foi observado o crescimento do material, um destes tubos foi exposto à iluminação fluorescente (30 a 60W), numa distância aproximada de 30 cm, durante 4 horas. Após esta exposição o tubo foi reincubado “overnight”. Foi observada a pigmentação desenvolvida após este período comparando com o tubo que não foi exposto à luz.

As micobactérias podem ser classificadas em quatro grandes grupos, observando-se o tempo de crescimento e a produção de pigmentos segundo classificação proposta por Runyon em 1958, e empregada pelo Ministério da Saúde (2006):

I. Fotocromogênicas: colônias não pigmentadas e que adquirem coloração variando de amarelo a laranja quando expostas a luz,

II. Escotocromogênicas: colônias adquirem cor variando de amarelo a laranja na presença ou ausência de luz,

III. Não cromogênicas: colônias não pigmentadas de coloração creme

IV. Crescimento rápido: desenvolvem colônias nos meios de cultura em menos de sete dias podendo ser pigmentadas ou não.

3.7 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS

Para a identificação das espécies foram utilizados métodos moleculares como a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) para a detecção de espécies pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis*, *PCR-restriction enzyme analysis* (PRA) (TELENTI *et al.*, 1993) para detecção de micobactérias ambientais, empregando em ambos os métodos o gene hsp65 e sequenciamento genético do DNA com três alvos diferentes (*hsp65*, *rpoB* e 16 S 500) para confirmação da espécie de micobactéria.

3.7.1. Identificação por PCR

O material para análise do DNA das micobactérias foi obtido diluindo-se uma alça da colônia em um a dois mililitros de salina fisiológica estéril em microtubo com base autossustentável e tampa de rosca e volume total de 1,5 ml, denominado de microtubo “C”, que foi identificado, armazenado e congelado em freezer a -18°C.

O procedimento de biologia molecular denominado de reação de cadeia de polimerase (PCR) foi realizado para identificar se as amostras pertenciam ao gênero *Mycobacterium*, sendo executados no Laboratório de Tuberculose do Instituto Biológico. Posteriormente, o material com resultado positivo foi encaminhado para o Centro de Referência Professor Hélio Fraga (CRPHF), na cidade do Rio de Janeiro, para a identificação da espécie por *PCR-restriction enzyme analysis* (PRA) e sequenciamento genético do DNA.

As amostras que apresentaram resultados duvidosos na execução do PCR no Instituto Biológico foram encaminhadas ao CRPHF para a realização de um novo PCR com o gene *hsp65*, com outros métodos de extração do DNA.

3.7.1.1. Extração de DNA micobacteriano

Para a extração do DNA micobacteriano a suspensão de colônias suspeitas, armazenadas no microtubo C, foi submetida ao procedimento de choque térmico: fervura por 5 minutos a 100 ^{o}C, e congelamento a -20°C, sendo mantidas congeladas até a realização das técnicas moleculares.

Nas amostras em que a extração de DNA por choque térmico não foi eficiente, optou-se pela execução de um novo método de extração no CRPHF.

Para este processo de extração de DNA, obteve-se uma nova massa de colônias da amostra suspeita, diluída em uma solução alcalina composta de 0,5 M de Citrato de Sódio e 0,05M de Hidróxido de Sódio armazenada no microtubo “C”. A solução foi agitada em Vortex AP56 (Phoenix, USA), mantida em repouso por 5 minutos, centrifugada a 2800 rpm por 5 minutos. O pellet obtido foi lavado com 0,5

ml de TRIS-HCL (pH 8,0) e ressuspendido em 100 µl de água livre de RNase (HALL et al, 2003).

3.7.1.2 Amplificações

Os primers empregados no método de PCR para o gene *hsp65* foram o Tb11(ACC AAC GAT GGT GTG GCC AT) e Tb 12 (CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT), responsáveis pela identificação de amostras pertencente ao gênero Mycobacterium.

O PCR foi realizado para um volume total de 50 µl contendo 35,9 µl de água ultra pura, 5 µl de tampão, 1,5 µl de $MgCl_2$, 5 µl de Glicerol , 1 µl de cada primer, 0,4 µl de dNTPs e 0,2 µl de Taq polimerase e 2ul de dna da extraído da cultura. Os parâmetros de amplificação foram: 95ºC por 5'; 45 ciclos de 94ºC por 1', 60ºC por 1' e 72ºC por 1'; e um ciclo final de 72ºC por 7'.Em cada grupo de amplificações foi utilizado como controle positivo DNA de *M. tuberculosis* H37Rv, e como controle negativo, alíquotas de água ultrapura (tipo I) estéril. As amplificações foram executadas em termociclador MJ Research PTC 100.

3.7.1.3 Eletroforese do produto amplificado

As eletroforeses foram realizadas em cuba horizontal, usando tampão de corrida TBE 1x (0,04 M Tris-acetato e 0,001 M EDTA, pH 8,0) a 0,5 M e gel de agarose a 1,0% (p/v). O volume de 5 µl do produto de PCR amplificado foram homogeneizados com 1µl de Gel Red (substituindo o Brometo de Etídio) e 2 µl de

tampão de carregamento (loading buffer) e aplicados no gel, que também recebeu um marcador de peso molecular, que foi aplicado a esquerda do gel. Após a eletroforese os resultados obtidos foram visualizados em transiluminador.

As amostras confirmadas para o gênero *Mycobacterium* foram encaminhadas ao CRPHF para a realização de técnicas moleculares como a *PCR-restriction enzyme analysis* (PRA) e sequenciamento genético do DNA com a finalidade de identificar a espécie de micobactéria isolada.

3.7.2 *PCR- restriction enzyme analysis* (PRA).

A técnica de *PCR- restriction enzyme analysis* (PRA) foi realizada no CRPHF a partir das amostras que, ao serem submetidas à PCR para gênero, apresentaram resultados positivos.

3.7.2.1 Preparação das amostras

Após a extração do DNA por fervura ou pelo método de Hall, as amostras foram homogeneizadas em Vortex AP56 (Phoenix, USA) e centrifugadas a *2800* rpm por 2 minutos e empregou-se o sobrenadante para análise de variabilidade com o gene hsp 65 pelo método PRA.

3.7.2.2. Amplificação

Dois microlitros do DNA de cada amostra foram adicionados a cada tubo contendo a mistura para a reação de PCR. Esta mistura com volume total de 50µl era composta de: 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl [pH 8.3], 1,5 mM $MgCl_2$, 10% glycerol, 200 mM [cada] dNTPs, 0.5 mM [cada] primer Tb11 e Tb12, e 1U de *Taq* polymerase (Invitrogen®). Para amplificação, foram realizados 45 ciclos (1 minuto a 95°C, 1 minuto a 60°C, e 1 minuto a 72°C) e uma extensão de 10 minutos a 72°C. Os primers empregados amplificaram um fragmento de 441 pares de base do gene hsp 65 (TELENTI *et al*., 1993). Controles positivos (DNA de H37Rv ATCC 27294) e controles negativos (sem nenhum DNA) foram incluídos em cada amplificação (COSTA *et al.*, 2010). Os produtos das amplificações foram submetidos à digestão com enzimas de restrição *Bst*EII (Invitrogen, Brasil) e *Hae*III (Invitrogen, Brasil) separadamente.

3.7.2.3 Análise de restrição

Para a digestão com a enzima *Bste*II, 20 µl do produto da PCR foi adicionado diretamente a uma mistura contendo 3µl de tampão, 7 µl de água ultra pura, 1 µl de Bste II e incubadas a 60°C por 3 horas. O mesmo processo foi executado para a enzima *Hae*III, com o emprego de 20µl do produto da reação em 3µl de tampão, 7 µl de água ultra pura e 1 µl de *Hae*III, por 37°C, pelo mesmo período de tempo. Os produtos digeridos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 5% (Invitrogen, Brasil) em tampão TBE 1X. Um volume de 7µl do produto da digestão foram homogeneizados com 1µl de Gel Red (substituindo o Brometo de Etídio) e 2

µl de tampão de carregamento (loading buffer) e aplicados no gel. Foi realizado um gel para avaliar os produtos de cada enzima. O padrão de digestão foi visualizado em transiluminador. Para o cálculo do tamanho e número de fragmentos, foi empregado marcador de peso molecular de 50 pb (Invitrogen, Brasil) aplicado na lateral esquerda de cada gel.

As imagens contidas no gel foram capturadas em fotodocumentador para fluorescência UV e luz branca Minibis Pro (DNR Bio Imagens systems®) e avaliadas visualmente com relação aos padrões formados. Estes padrões de PRA - *hsp 65* foram analisados e interpretados comparando os fragmentos obtidos com algoritmos descritos no site PRASITE (http://app.chuv.ch/prasite/index.html) (CHIMARA *et al.*, 2008)

3.8 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DO DNA DAS MICOBACTÉRIAS ISOLADAS.

Foram empregados três alvos diferentes com o objetivo de confirmar os resultados obtidos para a identificação das espécies no PRA.

Os alvos selecionados foram: o gene *hsp65*, o gene *rpoB* e o gene16S 500

3.8.1 Amplificação das micobactérias isoladas com os alvos selecionados.

Para a amplificação parcial do gene *rpoB*, os iniciadores descritos por Adekambi *et al*, 2003 foram utilizados:

Mycoseq F: 5' – GAAGGGTGAGACCGAGCTGAC - 3'

Mycoseq R: 5' - GCTGGGTGATCATCGAGTACGG - 3'

Para a amplificação parcial do gene *hsp65* os iniciadores descritos por Telenti *et al*, 2003 (TB11 e Tb12) foram utilizados:

Tb11 : 5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3'

Tb12 : 5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3'

Para a amplificação parcial do gene 16S 500 os iniciadores descritos por Hall *et al*, 2003 foram utilizados:

5'-TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

5'-TACCGCGGCTGCTGGCAC-3'

Para a amplificação foram adicionados em cada microtubo com capacidade de 200 µL: 2 µL de DNA (200 nanogramas), 1 µL de cada iniciador (50 pMoles/µL), 0,3 µL de dNTPs (25mM), 1,5 µL MgCl2 (50mM), 0,3 µL de Taq polimerase e 5 µL de tampão 10X e água ultra pura q.s.p., perfazendo um volume final de 50 µL.

Cada microtubo foi colocado em um termociclador, utilizando os seguintes ciclos: 94˚C por 4 minutos, e 30 repetições do seguinte ciclo: 94˚C por 45 segundos, 55˚C por 30 segundos e 72˚C por 30 segundos. Depois, 72˚C por 10 minutos e por final, 8˚C até as placas serem retiradas do aparelho.

Como controle positivo, foi utilizado o DNA de *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 e para o controle negativo, foi empregada água ultrapura estéril sem a presença de DNA.

3.8.2 Purificações e sequenciamento do material amplificado.

Os fragmentos amplificados foram purificados segundo as recomendações do fabricante do Kit Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, UK).

Em cada uma das reações de sequenciamento, foi utilizado 1,5 µL do kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems by Life Technologies, USA), 1 µL de tampão de sequenciamento 5X, 1,5 µL de água ultra pura, 2 µL de cada produto da PCR purificado (aproximadamente 20 nanogramas) e 4 µL de cada primer (3,2 pmoles) empregado nas PCR, separadamente. As reações ocorreram em um termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems by Life Technologies, USA), seguindo os seguintes parâmetros: 96°C por 1 minuto e depois 25 ciclos (96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos).

3.8.2.1 Precipitação do material

Adicionou-se 30µl de isopropanol 75% a cada amostra, realizou-se agitação por 10 segundos em Vortex AP56 (Phoenix, USA) e a placa foi mantida em repouso ao abrigo da luz por 15 minutos. O material foi submetido à centrifugação por 1 hora a 2800 rpm. Depois, o sobrenadante foi descartado, adicionado 50 µl de etanol a 75%, e houve a realização de nova centrifugação por 25 minutos a 2800 rpm. O sobrenadante foi novamente descartado e a placa foi submetida a aquecimento a 60°C por 10 minutos. Finalmente, a placa foi coberta com papel alumínio e armazenada a – 20°C.

3.8.2.2 Desnaturação com formamida

Após o processo de precipitação, os produtos de sequenciamento foram preparados para serem submetidos à eletroforese no sequenciador automático capilar. A formamida permite a desnaturação, separando as fitas duplas de DNA a serem analisadas no aparelho. 10 µL de formamida HI-DI Sequencing (Applied Biosystems by Life Technologies, USA) foram adicionados em cada poço da placa, posteriormente aquecido por 3 minutos a 95 ºC e, em seguida, colocada em gelo por 5 minutos.

3.8.3 Sequenciamento genético do DNA

O sequenciamento genético foi feito no aparelho ABI Prism 3130 Genetic Analyzer Sequencing (Applied Biosystems by Life Technologies, USA), sendo que as sequências obtidas foram conferidas e editadas com o auxílio do programa ChromasPro versão 1.42 (http://www.technelysium.com.au/chromas.html).

Então, essas sequências foram comparadas com outras provenientes de cepas tipo obtidas no GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide), utilizando o programa Basic Local Alignment Search Tool - BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) disponível na internet no endereço: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.

3.8.4 Análise dos resultados do sequenciamento genético do DNA

A identificação genética é considerada confiável quando a sequência obtida do material avaliado apresentar 100% de identidade com a sequência produzida por uma cepa padrão, ou cepa tipo.

Para a sequência de identificação do gene *hsp* 65 das micobactérias não tuberculosas, os pesquisadores consideram que a identificação pode ser confiável quando a comparação entre a sequência da amostra e da cepa tipo apresentarem ambigüidade superior a 97%, segundo critérios padronizados (MCNABB *et al*., 2004). A sequência de identificação do gene *rpoB* da amostra deve apresentar ambiguidade maior que 98% com a cepa padrão para que a identificação seja confiável (ADEKAMBI *et al*, 2006). Para as avaliações das sequências de identificação do gene 16S 500, espera-se ambiguidade maior que 99% entre a amostra avaliada e a cepa tipo (COSTA et al., 2010a; TORTOLI, 2010).

Estes valores foram considerados e aplicados nas análises dos resultados do sequenciamento genético do DNA por diferentes alvos, das micobactérias isoladas de formigas.

3.9 ÁRVORES FILOGENÉTICAS

Foram construídas árvores filogenéticas para as espécies de micobactérias que pela identificação realizada por sequenciamento genético de DNA apresentaram identificação superior a 97% para o gene *hsp* 65; superior a 98% para o gene *rpoB* e superior a 99% para o gene *16S*500.

As árvores construídas eram concatenadas empregando as sequências dos genes hsp65, rpoB e 16S, com 441 pares de base do gene hsp 65, aproximadamente 711 pares de base do gene rpoB, e 500 pares de base do gene 16 S, ou seja, sequenciamento parcial dos três genes, empregou-se o método de neighbor-joining, com modelo de correção Kimura-2-parâmetros no programa MEGA (v 4.0; Tamura, Dudley, Nei and Kumar [http://www.megasoftware.net/]), empregando *Corynebacterium pseudotuberculosis* CIP 102968 como grupo externo em todas as árvores realizadas.

As sequências empregadas para comparação na primeira árvore foram obtidas do GenBank e compreendiam: *M. chelonae*, CIP104535; *M. novocastrense*, CIP105546; *M. avium* subespécie *avium*, ATCC 25291; *M. immunogenum*, CIP106684; *M. tuberculosis* - H37rv; *M. fortuitum*, CIP104534; *M. abscessus*, CIP104536.

Para a realização da segunda árvore, as sequências obtidas do GenBank utilizadas foram: *M. murale*, CIP105980; *M. fortuitum*, CIP104534; *M. chelonae*, CIP104535; *M. vaccae*, CIP105934; *M. holsaticum*, DSM44478; *M. chitae*,

CIP105383; *M. confluentis*, CIP105510; *M. rhodesiae*, CIP106806; *M. tuberculosis*, H37Rv; *M. avium* subespécie *avium*, ATCC 25291.

4 RESULTADOS

4.1 FORMIGAS

Para a avaliação do potencial de formigas como vetores de micobactérias, foram coletados 247 espécimes de formigas no Hospital selecionado (Tabela 1)

Após a reforma do hospital ocorrida em 2008, foram realizadas seis coletas durante os anos de 2009 e 2010, quatro destas coletas, foram efetuadas nas estações climáticas com temperaturas mais elevadas (temperatura média de 30°C), primavera e verão (outubro/2009, janeiro/2010, fevereiro/2010 e novembro/2010) e duas coletas foram efetuadas nas estações climáticas mais amenas (temperatura média de 20 ^{o}C), outono e inverno (março e julho de 2009).

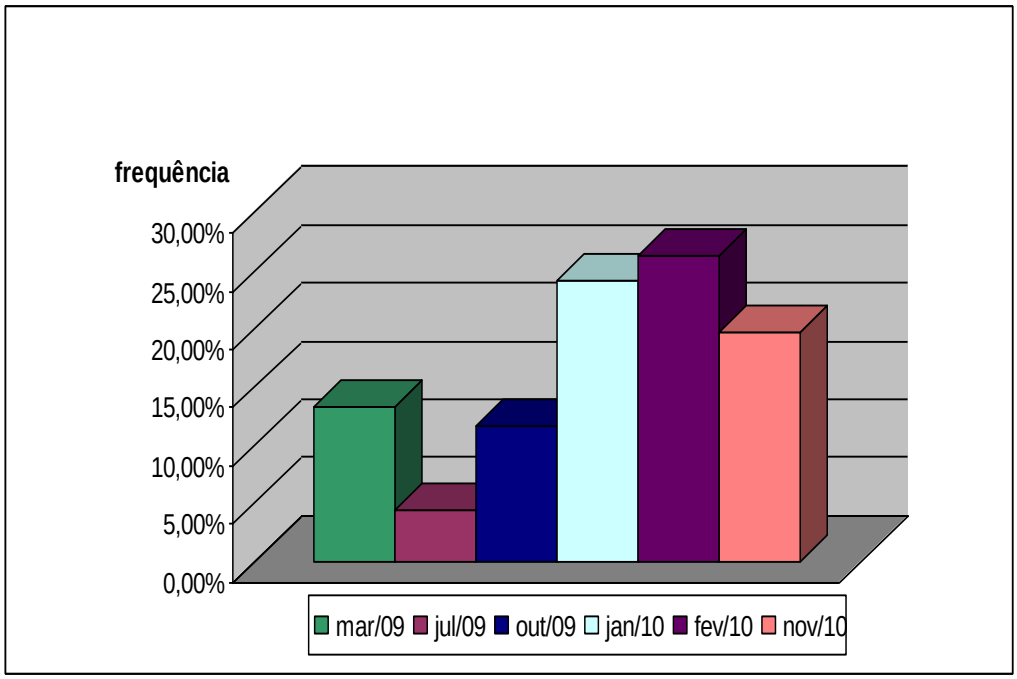
Nas estações de primavera e verão foram coletados 203 espécimes de formigas, enquanto nas estações de outono e inverno, somente 44 exemplares foram coletados (Tabela 1).

Como o hospital escolhido interna seus pacientes, a coleta de formigas foi realizada durante o dia, com interferências mínimas em suas rotinas. Estas coletas concentraram-se entre 11 horas e 16 horas, período de maior atividade dos artrópodes estudados, segundo as orientações da pesquisadora do Instituto Biológico, especialista em pragas urbanas.

Tabela 1: Formigas coletadas segundo o mês e o ano da coleta, em hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose, 2009-2010.

Mês Coleta	***Ano coleta***	***Número***	***Frequência***
Março	2009	33	13,36
Julho	2009	11	4,45
Outubro	2009	29	11,74
Janeiro	2010	60	24,29
Fevereiro	2010	65	26,32
Novembro	2010	49	19,84
Total		***247***	***100%***

Gráfico 1: Frequência de formigas coletadas segundo os meses em que as coletas foram realizadas, em hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose, 2009 - 2010.



4.2 FORMIGAS OBTIDAS SEGUNDO O MÉTODO DE COLETA EMPREGADO

4.2.1 Método de coleta manual diretamente sobre a formiga

A coleta manual emborcando o microtubo “A” sobre a formiga foi executada em todas as coletas e com maior frequência.

Este método capturou 143 espécimes de formigas, o que corresponde a 57,9% dos exemplares coletados.

A coleta por este método foi maior porque, assim que as formigas eram visualizadas, emborcava-se o microtubo A sobre o inseto e esperava que subisse pelo interior do microtubo para depois fechá-lo com tampa de rosca. Nos ambientes em que a densidade de formigas era alta, somente a coleta manual foi efetuada. Isto porque como a coleta de formigas era individual, cada formiga coletada era colocada em um microtubo e identificada, isto facilitava a execução dos procedimentos em laboratório, já que as formigas eram processadas dentro do próprio microtubo da coleta, sem a necessidade de transferi-las para outro recipiente.

4.2.2 Método de coleta com isca atrativa

A coleta com isca atrativa foi empregada para atrair um maior numero de formigas, principalmente nos locais onde a sua presença era escassa ou nula, sendo realizado nas coletas de outubro de 2009, janeiro, fevereiro e novembro de 2010.

Este método capturou 104 espécimes de formigas, que correspondem a 42,1% de todas as formigas coletadas.

O primeiro método de isca atrativa, composto de mel colocado em um pedaço de papel adesivo para roedores, foi ineficaz. Este material foi colocado no hospital por um período de 24 horas, e as expectativas eram coletar espécies de hábito noturno. Mas, as formigas apreendidas, não puderam ser processadas pela impossibilidade de retirá-las do papel adesivo, além de atrair outros artrópodes que não eram alvo desta pesquisa.

O método de isca atrativa com mel, bolo de abacaxi e fígado desidratado foi eficiente e após 20 a 30 minutos de exposição da isca, no ambiente, as formigas

foram atraídas e uma média de 5 a 6 formigas foram coletadas no interior de cada microtubo. e puderam ser capturadas.

Estas iscas foram adequadas ao ambiente hospitalar, por permanecer um período curto de tempo, ser de fácil aplicação e não atrair a curiosidade em excesso dos pacientes e funcionários do hospital. Os resultados obtidos foram eficientes quanto à atração das formigas, mesmo nos locais onde sua presença era pequena. Isto possibilitou otimizar o procedimento de coleta e aumentar o número de formigas coletadas.

4.2.3 Método de coleta manual com pincel

O método de coleta manual com pincel destinou-se a captura de formigas para a identificação de espécies, e ocorreu em todas as coletas. As formigas foram coletadas em número suficiente para a identificação das espécies.

4.3 OCORRÊNCIA DAS FORMIGAS NO HOSPITAL SEGUNDO O LOCAL DA COLETA

As formigas foram detectadas e coletadas em diferentes ambientes do hospital (Tabela 2).

Os ambientes em que exemplares de formigas foram coletadas foram descritos a seguir:

- Área interna de uma porta de saída do hospital, designada como serviço,
- Área externa próxima a uma porta de saída do hospital, designada como serviço,
- solarium dos pacientes,
- quarto dos pacientes,
- banheiro dos pacientes,
- sala multiuso dos pacientes,
- refeitório dos funcionários,
- sala de roupa limpa,
- área externa do hospital,
- entrada área de internação,
- administração,
- lixo presente no solarium dos pacientes,
- tampa do vaso sanitário dos pacientes,
- copo de bebida dos pacientes.

A coleta de formigas foi intensificada nos ambientes internos do hospital, principalmente nas áreas de permanência dos pacientes como: solarium, quartos e

banheiro, já que estes ambientes poderiam revelar dados sobre o risco potencial das formigas como vetores mecânicos de micobactérias.

Nas áreas externas do hospital que dispõem de gramados e jardins foi encontrada uma intensa diversidade de formigas.

Nestes locais foram coletados 38 espécimes de formigas, sendo considerado um dos pontos de maiores coletas no hospital, mesmo com a realização de uma coleta menos detalhada. Isto porque, à distância destas áreas com a ala dos pacientes internados e a pequena presença dos pacientes nestes locais, não justificavam uma coleta maciça com o propósito de avaliar o potencial de formigas como vetores de micobactérias.

Em áreas como o solarium dos pacientes, além da presença de formigas foi detectado trilhas, e orifícios de acesso aos ninhos. As trilhas encontradas localizavam-se na entrada dos quartos dos pacientes, nas lixeiras existentes no solarium e próximas a restos de alimentos.

Nos quartos dos pacientes, as formigas foram visualizadas no parapeito das janelas, próximo às camas e nos armários dos pacientes, contendo objetos pessoais, alimentos e copos para bebida. Formigas também foram visualizadas e coletadas no copo de bebida de um paciente, disposto no parapeito do quarto.

No banheiro dos pacientes foram detectados: orifícios de acesso aos ninhos, trilhas e formigas, dispersas nas paredes, no chão, nas louças sanitárias (pia e vaso), na tampa do vaso sanitário e nos escarros dos pacientes.

No espaço multiuso, as trilhas das formigas foram visualizadas próximas a restos de alimentos, nos pratos dos pacientes, na lixeira e em copos descartáveis com restos de bebida.

Nas áreas administrativas do hospital, localizadas no primeiro andar, observou-se a presença de formigas aleatoriamente e sempre próximas à porta de acesso para o ambiente externo. Nestes espaços, não foram detectadas trilhas.

Tabela 2: Formigas coletadas pelo método manual e com isca atrativa, nos diferentes ambientes do hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose no estado de São Paulo, 2009-2010.

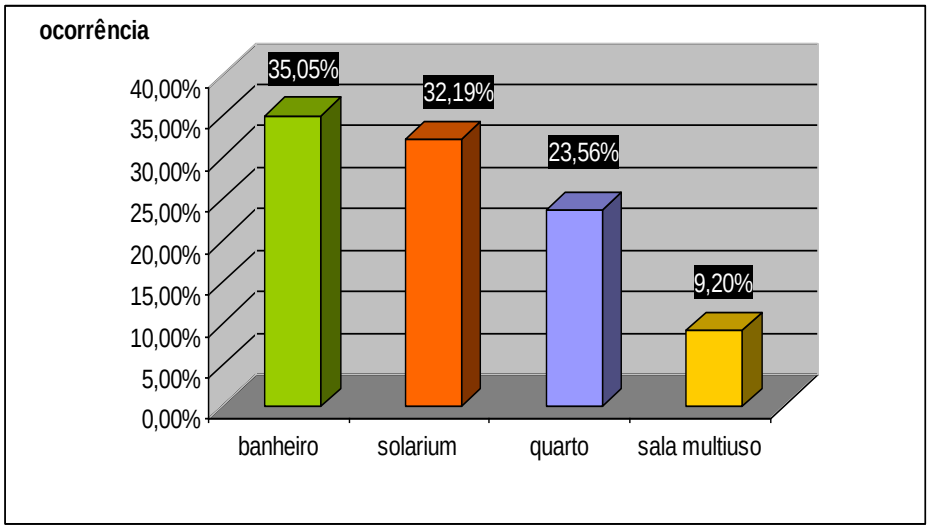
Ambiente hospitalar	***Formigas coletadas***	***Frequência***
Área externa	**38**	**15,4**
Porta serviço área interna	**12**	**4,9**
Solarium	**56**	**22,7**
Corredor ala internação	**7**	**2,8**
Sala de roupa limpa	**1**	**0,40**
Administração	**1**	**0.40**
Entrada internação	**1**	**0,40**
Sala multiuso	**16**	**6,5**
Refeitório funcionários	**13**	**5,3**
Quartos pacientes	**28**	**11,3**
Banheiros pacientes	**50**	**20,2**
Copo paciente no quarto	**13**	**5,3**
Tampa vaso banheiro	**11**	**4,4**
Total de formigas coletadas	**247**	**100**

Desta forma, de um total de 247 formigas coletadas, 174 espécimes de formigas (70,4%) foram coletadas nas áreas de convívio dos pacientes (gráfico 2), e nas demais áreas, caracterizadas pela ausência de convívio dos pacientes foram coletadas 73 espécimes(30,6%).

Os locais de convívio dos pacientes com maior número de formigas coletadas foram:

- banheiro dos pacientes: 61formigas
- solarium dos pacientes: 56 formigas,
- quarto dos pacientes: 41 formigas,
- sala multiuso: 16 formigas.

Gráfico 2: Ocorrência das 174 formigas coletadas nas áreas de convívio dos pacientes internos em hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose no estado de São Paulo, 2009 -2010.



No solarium dos pacientes internados (Figura 1) alguns elementos facilitaram a presença e a disseminação destes espécimes, como o piso do local, com fissuras possibilitando a instalação de ninhos, a ausência de janelas ou qualquer isolamento para o ambiente externo, e a presença de restos de alimentos e lixeiras destampadas (Figura 2).

Figura 1: Solarium do hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose no estado de São Paulo, 2009 - 2010.

Figura 2: Lixeira destampada localizada no solarium do hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose no estado de São Paulo, 2009 - 2010.

O Hospital selecionado foi totalmente reformado e encontra-se em perfeito estado de conservação (Figura 3), o que não impediu a presença e a coleta de diferentes espécies de formigas.

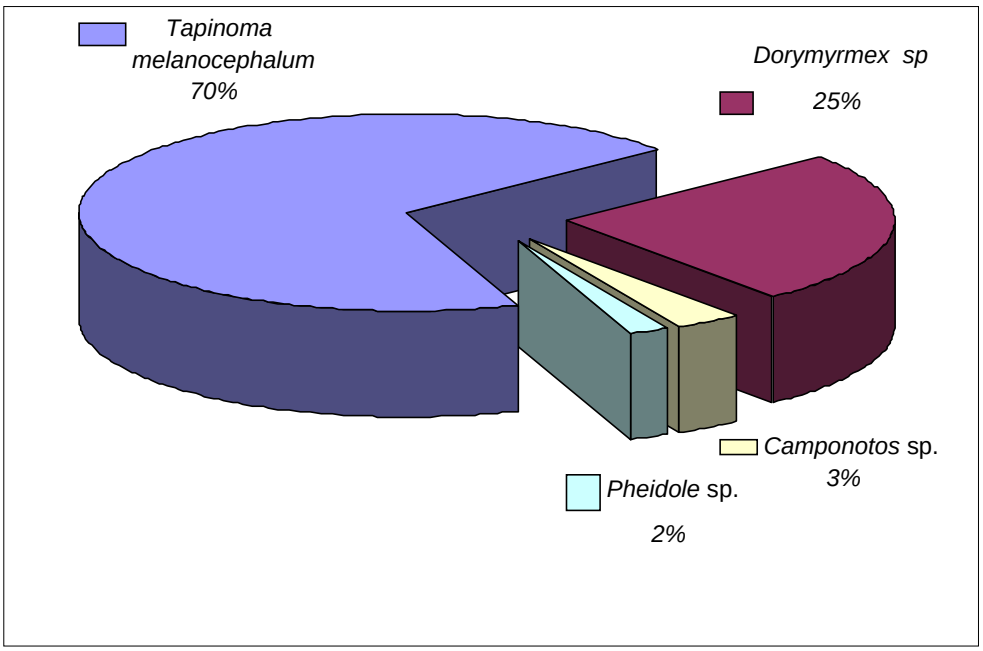
Figura 3: Sala multiuso do hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose, 2009 - 2010.

4.4 ESPÉCIES DE FORMIGAS COLETADAS.

Foram identificadas quatro espécies de formigas: *Dorymyrmex* sp., *Pheidole* sp., *Camponotos* sp. e *Tapinoma melanocephalum*, relacionadas abaixo: (Gráfico 3)

- 172 espécimes de *Tapinoma melanocephalum*
- 62 espécimes de *Dorymyrmex* sp.,
- 8 espécimes de *Camponotos* sp.,
- 5 espécimes de *Pheidole* sp.

Gráfico 3: Frequência de espécies de formigas coletadas no hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose no estado de São Paulo, 2009 - 2010.



Nas coletas pelo método manual diretamente sobre as formigas, a espécie predominante foi a *T. melanocephalum*. Esta espécie, também foi a mais frequente no método de coleta com iscas atrativas.

4.5 CULTURA E ISOLAMENTO DE MICOBACTÉRIAS A PARTIR DAS FORMIGAS.

Para o cultivo e isolamento de micobactérias a partir de um exemplar de formiga, foram empregados os métodos de inoculação direta e Petroff já descritos. Nesta etapa, foram processadas todas as formigas coletadas, perfazendo um total de 247 amostras.

Cada amostra foi semeada em dois tubos de meio de cultura Löwestein-Jensen e dois tubos de meio de cultura Stonebrink, e incubados a 37°C até 90 dias.

As culturas que após este período não apresentaram a presença de qualquer crescimento foram consideradas negativas. De todas as 247 culturas avaliadas, 144 não apresentaram crescimento e 103 consideradas culturas com crescimento suspeito.

4.5.1 Culturas com a presença de crescimento suspeito

Após a leitura dos meios de cultura, 103 culturas foram avaliadas como suspeitas para o crescimento de micobactérias.

Para estas culturas foram realizadas a coloração de Ziehl-Neelsen, e consideradas positivas as culturas cujas lâminas foram visualizados os BAAR.

As culturas, cuja avaliação das lâminas por esta coloração não foi suficiente, foram submetidas à coloração de Auramina O, e na persistência de dúvida, executou-se à coloração de Gram e análise deste material por uma bacteriologista.

A este processo tintorial foram submetidas aquelas culturas, em que foram observados macroscopicamente: crescimento rápido (um a dois dias) e a presença de

colônias esbranquiçadas. E na avaliação microscópica, presença de BAAR pelo método de Ziehl-Neelsen.

As 103 culturas que inicialmente apresentaram crescimentos identificados como suspeitos, após a realização dos métodos de coloração, foram classificadas como (Tabela 3 e Gráfico 4):

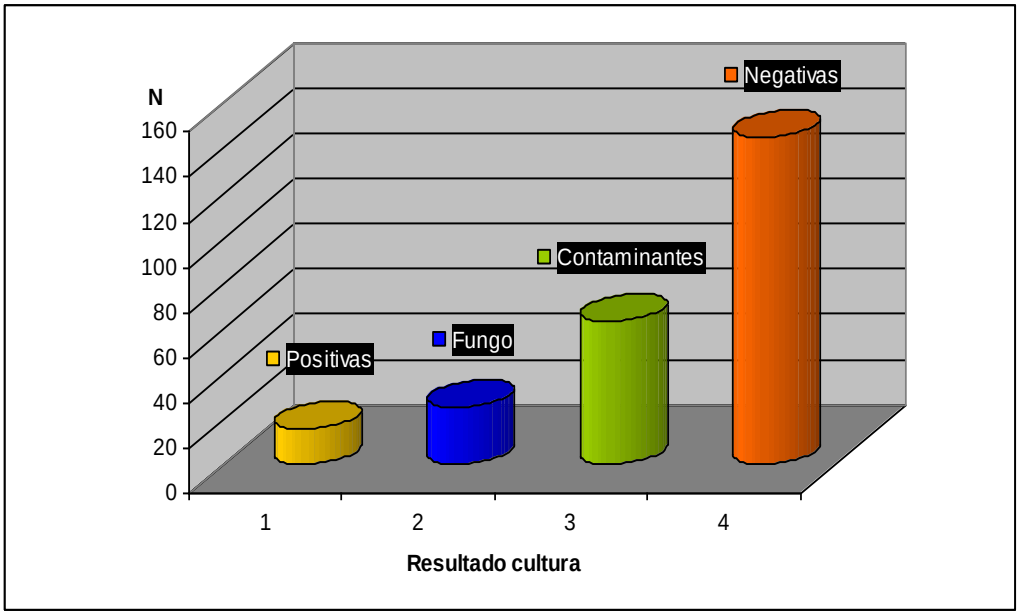
- 63 culturas com crescimento de contaminantes, dentre eles o gênero *Bacillus* sp.,
- 25 culturas com crescimento de leveduras,
- e 15 culturas identificadas como positivas, pela presença de BAAR.

Tabela 3: Resultados das culturas obtidas de formigas segundo o local da coleta realizada em hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose no estado de São Paulo, 2009 - 2010.

Local da coleta	***Método***	***Contaminantes***	***Fungos***	***Positiva***	***Total***
Solarium	Manual e Isca	10	7	3	20
Saída serviço área interna	Manual e Isca	3	-	2	5
Área externa	Manual e Isca	7	1	1	9
Quartos	Manual e Isca	6	3	3	12
Banheiro paciente	Manual e Isca	22	8	1	31
Tampa vaso	Coleta manual	3	-	2	5
Copo paciente	Coleta manual	1	4	1	6
Refeitório funcionários	Manual e iscas	2	1	-	3
Sala multiuso	Manual e iscas	5	1	2	8
Área externa porta serviço	Manual e iscas	4	-	-	4
Total		***63***	***25***	***15***	***103***

Um percentual de 6,7% das 247 amostras de formigas processadas para o isolamento e identificação de micobactérias, apresentou crescimento suspeito e a presença de BAAR.

Gráfico 4: Resultado das culturas segundo a avaliação dos métodos de coloração, obtidas de formigas coletadas no hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose no estado de São Paulo, 2009 - 2010.



As culturas identificadas como positivas pela presença de BAAR foram repicadas em meio de cultura Löwestein-Jensen e destas, foram extraídas colônias para a execução de métodos moleculares.

4.5.2 Testes bioquímicos para a identificação de micobactérias.

Os testes bioquímicos empregados na identificação de micobactérias demandam tempo, são trabalhosos e nem sempre fornecem resultados claros e em muitos casos a identificação da espécie não é concluída. Por estes motivos, optou-se apenas pela avaliação do tempo de crescimento e a produção de pigmentos, conforme estabelece o manual de bacteriologia da tuberculose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Nesta etapa foram avaliadas 15 culturas positivas para a coloração, coletadas nos seguintes ambientes do hospital:

F.21 – solarium pacientes (ambiente com convívio dos pacientes)

F.27 – área interna porta serviço (ambiente sem convívio dos pacientes)

F.28 – área interna porta serviço (ambiente sem convívio dos pacientes)

F.38 – área externa (ambiente sem convívio dos pacientes)

F.99 – quarto paciente (ambiente com convívio dos pacientes)

F.142- solarium pacientes (ambiente com convívio dos pacientes)

F.145- solarium pacientes (ambiente com convívio dos pacientes)

F.184 e F.185 – banheiro dos pacientes (ambiente com convívio dos pacientes)

F.210 – quarto paciente (ambiente com convívio dos pacientes)

F.211 – quarto paciente (ambiente com convívio dos pacientes)

F.215 – sala multiuso (ambiente com convívio dos pacientes)

F.222 – sala multiuso (ambiente com convívio dos pacientes)

F.233 – copo paciente (ambiente com convívio dos pacientes)

F.235 – copo paciente (ambiente com convívio dos pacientes)

Quanto ao tempo de crescimento, todas as culturas apresentaram crescimento rápido: menor que sete dias.

Em relação à produção de pigmentos, as culturas foram classificadas como: (Tabela 4).

- Oito culturas escotocromogenas, ou seja, com presença de pigmento independente da presença de luz, de coloração amarelo-alaranjado. F.21, F.27, F.99, F.210, F.211, F.215, F.222 e F.233.
- Sete culturas classificadas como acromógenas, devido à ausência de pigmento, com colônias de coloração creme. F.184, F.185, F.28, F.38, F.235, F.142 e F.145.

Tabela 4: Resultado das culturas isoladas de formigas, segundo a avaliação da produção de pigmento, coletadas no, em hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose no estado de São Paulo, 2009 - 2010.

Amostra	Produção de pigmento	Classificação
F.21	Sim	Escotocromogenas
F.27	Sim	Escotocromogenas
F.184	Não	Acromógena
F.185	Não	Acromógena
F.99	Sim	Escotocromogenas
F.210	Sim	Escotocromogenas
F.211	Sim	Escotocromogenas
F.215	Sim	Escotocromogenas
F.222	Sim	Escotocromogenas
F.233	Sim	Escotocromogenas
F.28	Não	Acromógena
F.38	Não	Acromógena
F.235	Não	Acromógena
F.142	Não	Acromógena
F.145	Não	Acromógena

4.6 MÉTODOS MOLECULARES

4.6.1 Resultados do método de PCR

Neste processo de avaliação, das 15 amostras inicialmente positivas, 12 foram identificadas como pertencentes ao gênero *Mycobacterium*, o que pôde ser comprovado devido à presença de uma banda em gel de agarose, com peso molecular idêntico ao controle positivo.

Três amostras (F.235, F.142, F.145) não apresentaram resultados conclusivos nos métodos de coloração utilizados (Ziehl-Neelsen, Auramina O e Gram), permanecendo a dúvida se eram espécies de micobactérias. Ao serem avaliadas pelo método de PCR para averiguar se pertenciam ao gênero *Mycobacterium*, os resultados obtidos foram negativos, com ausência da formação de bandas no gel de agarose.

As amostras consideradas positivas no PCR foram:

- F.21, F.27, F.184, F.185, F.99, F.210, F.211, F.215, F.222, F.233, F.28, F.38.

As amostras consideradas negativas no PCR foram:

- F.235, F.142, F.145.

Os resultados foram repetidos pelo menos duas vezes para evitar dúvidas.

4.6.2 *PCR - restriction enzyme analysis* (PRA)

As 12 amostras positivas para o gênero *Mycobacterium* no PCR, foram submetidas ao método de PRA-*hsp65*, para a identificação da espécie.

Estas amostras foram submetidas inicialmente, a um PCR, para a amplificação de um fragmento de 441 pares de bases do gene *hsp65*.

Em dez amostras, o produto amplificado foi satisfatório, o que permitiu a execução da etapa seguinte do método. Em duas amostras, apesar de inúmeras tentativas, não foi possível a amplificação. Por este motivo, estas duas amostras foram excluídas das análises.

As seguintes amostras apresentaram resultados satisfatórios: F.21, F.27, F.184, F.185, F.99, F.210, F.211, F.215, F.222, F.233. (Tabela 5)

Das amostras F.28 e F.38 não foi possível obter o produto amplificado. Estas amostras eram provenientes de culturas com presença de contaminantes.

Estes contaminantes foram identificados como bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* sp., de crescimento muito rápido. Os isolamentos com este tipo de contaminação foram submetidos a sucessivos repiques e ao emprego do método de descontaminação por Petroff, para a obtenção de colônias puras. Mas este procedimento não foi eficiente, e os resultados para o PCR permaneceram negativos.

O produto amplificado foi digerido com enzimas de restrição específicas (*Bst*EII, *Hae*III) e os fragmentos resultantes deste processo foram comparados com algoritmos disponíveis no site: http://app.chuv.ch/prasite/index.html.

Tabela 5: Descrição dos fragmentos formados pelo método de PRA e a correlação com a espécie de micobactéria isoladas em formigas coletadas no hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose no estado de São Paulo, 2009-2010.

Formiga	*Enzima BSTe*			*Enzima HaeIII*			*Espécie*
F.21	235	120	85	150	80	65	*M. murale*
F.27	235	210	-	150	95	60/55	*M. chubuense*
F.184	330	130	-	200	65	50	*M. chelonae*
F.185	330	130	-	200	65	50	*M. chelonae*
F.99	440	-	-	175	87	59	*M. gadium*
F.210	440	-	-	175	87	59	*M. gadium*
F.211	440	-	-	175	87	59	*M. gadium*
F.215	440	-	-	175	87	59	*M. gadium*
F.222	233	129	79	181	161	40	*M.senegalense Type 4*
F.233	440	-	-	145	139	59	*M. duvalli type 4*

Nota: Quando a enzima de restrição não consegue clivar O DNA da amostra, é mostrado o tamanho total do fragmento, que possui 441 pares.

. De todas as formigas coletadas no hospital e submetidas ao isolamento, em 4,85% foram confirmadas as presenças de micobactérias pelo emprego do método de PCR.

A identificação da espécie de micobactéria isolada a partir de formigas foi realizada em 83,33% das amostras com resultados positivos no método de PCR.

4.6.3 Sequenciamento

O seqüenciamento das amostras foi realizado para confirmar os resultados obtidos no método PRA.

Para o gene *hsp65* os resultados obtidos das análises das amostras foram:

- F.21 apresentou 98,25% de similaridade com a cepa tipo da espécie *Mycobacterium murale* (*M.murale*).
- F.27 apresentou baixa identidade com a cepa tipo da espécie *Mycobacterium setense* (94,5%).
- F.184 e F.185 apresentaram 100% de identidade com a cepa tipo da espécie *Mycobacterium chelonae (M. chelonae)*
- F.99, F.210, F.211 e F.215 apresentaram baixa similaridade (96,25%) com a cepa tipo da espécie *M. novacastrense* (*M.novacastrense).*
- F. 222 apresentou 100% de identidade com a cepa tipo da espécie *Mycobacterium doricum* (*M. doricum*).

- F. 233 apresentou 97,01% de identidade com a cepa tipo da espécie M*ycobacterium komossense* (*M. komossense*)

Para o gene *rpoB* os resultados obtidos das análises das amostras foram:

- F.21 apresentou 97,64% de identidade com a cepa tipo da espécie *M. murale*.
- F. 27 apresentou baixa identidade com a cepa tipo da espécie *M. wolinski* (91,57%)
- F.184 e a F.185 apresentaram 100% de identidade com a cepa tipo da espécie *M. chelonae*.
- F.99, F. 210, F.211 e F.215 - em todas estas amostras os resultados foram idênticos, baixa identidade (93,5%) com a sequencia da cepa tipo da espécie *M. flavescens*.
- F.222 apresentou baixa identidade (92,9%) com a cepa tipo da espécie *M. monacaense.*
- F.233 também apresentou baixa identidade (95,42%) com a cepa tipo da espécie *M. smegmatis.*

Para o gene 16S *rRna* 500 os resultados obtidos das análises das amostras foram:

- F.21 apresentou baixa identidade (98,48%) com a cepa tipo da espécie *M. murale*.
- F.27 apresentou baixa identidade (98,12%) com a cepa tipo da espécie *M. rhodesiae.*

- F.184 e F.185 apresentaram 100% de identidade com a cepa tipo da espécie *M. chelonae*.
- F.99, F.210, F.211, F.215 apresentaram identidade de 97,84% com a cepa tipo da espécie *M. moriokaense.*
- F.222 apresentou baixa identidade com uma sequencia, presente no banco de dados GenBank, de uma espécie de bactéria, descrita como não cultivável.
- F.233 apresentou 100% de identidade com a cepa tipo da espécie *M. parafortuitum.*

Na tabela 6 foram transcritos os resultados do sequenciamento utilizando os diferentes alvos.

Tabela 6: Espécies de micobactérias identificadas pelo sequenciamento de três diferentes alvos, isoladas de formigas coletadas no hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose do estado de São Paulo, 2009 - 2010.

Amostra	Resultado *hsp 65*	Resultado *rpo*B	Resultado 16 S 500
F.21	98.25% *M.murale* CIP105980	97.64% *M. murale* CIP 105980	98,4% *M. murale* CCUG 39728
F.27	94.5% *M.setense*	91.57% *M.wolinskyi* ATCC 700010_	98,12% *M. rhodesiae* DSM44223
F.184	100% *M. chelonae* AM 902969.1.	99.44% *M. chelonae* EU109288.1	100% *M. chelonae* JCM 6388
F.185	100% *M. chelonae* AM 902969.1.	100% *M. chelonae* EU109288.1	100% *M. chelonae* JCM 6388
F.99	96.25% *M. novocastrense* CIP105546	93.5% *M. flavescens*, AY859698.1	97,84% *M. moriokaense* CIP 105393
F.210	96.25% *M. novocastrense* CIP105546	93.5% *M. flavescens*, AY859698.1	97,84% *M. moriokaense* CIP 105393
F.211	96.25% *M. novocastrense* CIP105546	93.5% *M. flavescens*, AY859698.1	97,84% *M. moriokaense* CIP 105393
F.215	96.25% *M. novocastrense* CIP105546	93.5% *M. flavescens*, AY859698.1	97,84% *M. moriokaense* CIP 105393
F.222	100% *M. doricum*, DSM 44339	92.9%*M. monacense*.	98.35% id Uncultured beta proteobacterium clone EF417611.1
F.233	97.01% *M. komossense* AY 438649.1.	95.42% *M. smegmatis*	100% *M. parafortuitum*

A concordância entre o método de PRA e o sequenciamento genético das amostras foi de 30%.

4.7. ÁRVORE FILOGENÉTICA

As árvores filogenéticas foram construídas para a confirmação da identificação das amostras de micobactérias, que através do sequenciamento foram consideradas como válidas através da análise de pelo menos dois dos alvos genéticos utilizados (Figuras 4 e 5).

As amostras de formigas com isolamento de micobactérias, que apresentaram resultados válidos, foram às amostras F.184 e F.185, identificadas através do sequenciamento como pertencentes à espécie *M. chelonae,* e a F.21 identificada como *M. murale.*

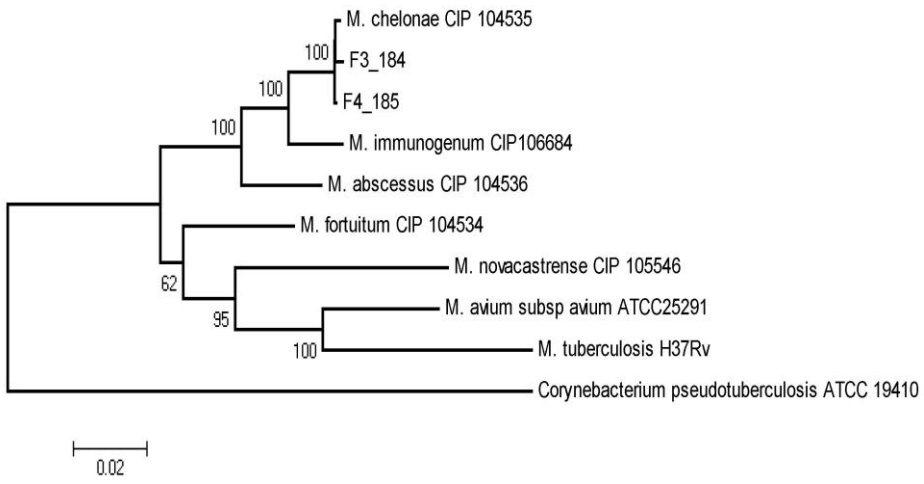


Figura 4: Árvore filogenética concatenada dos genes *hsp*65, *rpoB* e 16S r*Rna* construída através do método de Neighbor-Joining,com modelo de correção de Kimura-2 parâmetros e valores de bootstrap estimados a partir de 100 replicações, da amostra de micobactéria identificada como *M. chelonae* isolada de formiga no hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose no estado de São Paulo, 2009- 2010.

A cepa tipo de *M. chelonae* e as amostras F. 184 e F.185 foram incluídos na árvore em um grupo monofilético, suportado por um alto valor de bootstrap (100%).

A segunda árvore filogenética realizada foi da amostra identificada como pertencente à espécie *M. murale*.

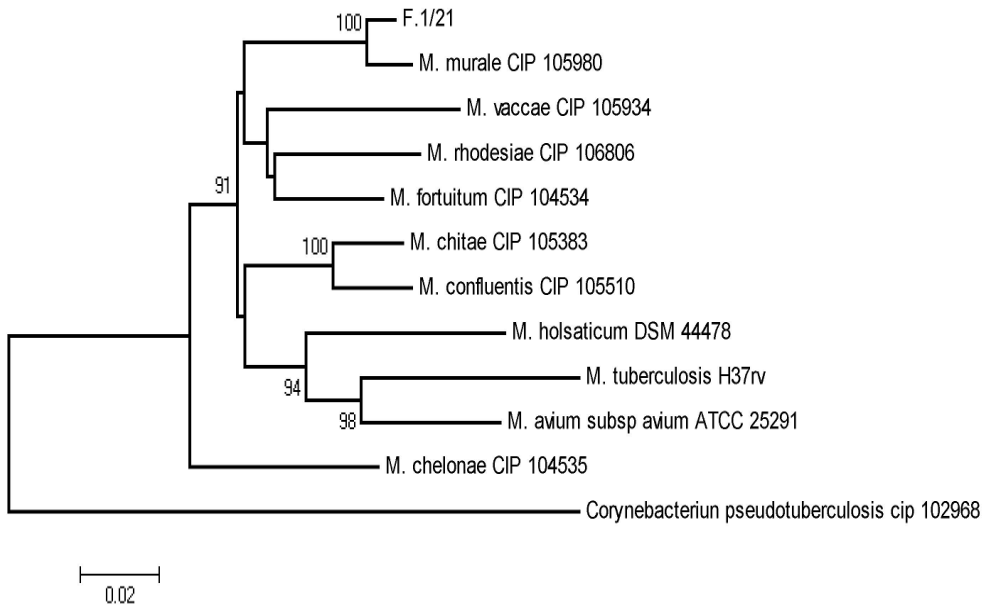


Figura 5: Árvore filogenética concatenada dos genes *hsp*65, *rpoB* e 16S r*Rna* construída através do método de Neighbor-Joining,com modelo de correção de Kimura-2 parâmetros e valores de bootstrap estimados a partir de 100 replicações, Árvore filogenética da amostra de micobactéria identificada como *M. murale* isolada de formiga no hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose no estado de São Paulo 2009-2010.

A cepa tipo de *M. murale* e a F. 21 foram incluídos na árvore em um grupo monofilético, suportado por um alto valor de bootstrap (100%).

Na Tabela 7 foi relacionado o local, o método e a as espécies de formigas coletadas, das quais foram isoladas micobactérias e identificação quanto à espécie das mesmas.

Tabela 7: Espécies de formigas em que foram isoladas micobactérias, segundo o local da coleta no hospital especializado na assistência de pacientes com tuberculose do estado de São Paulo, 2009 – 2010

Amostra	Espécie de formiga	Data coleta	Local da coleta	Método de coleta	Espécie micobactéria
F.21	*Pheidole sp*	Março 2009 (1)	Solarium dos pacientes	Coleta manual	*M. murale*
F.27	*Dorymyrmex sp*	Março 2009 (1)	Área interna saída serviço	Coleta manual	Não identificada
F.184	*Tapinoma melanochepalum*	Fevereiro 2010 (5)	Tampa vaso sanitário banheiro do quarto de numero 6	Coleta manual	*M. chelonae*
F.185	*Tapinoma melanochepalum*	Fevereiro 2010 (5)	Tampa vaso sanitário banheiro do quarto numero de 6	Coleta manual	*M. chelonae*
F.99	*Tapinoma melanocephalum*	Janeiro 2010 (4)	Quarto paciente de numero 5	Coleta manual	Não identificada
F.210	*Tapinoma melanocephalum*	Fevereiro 2010 (5)	Quarto paciente de numero 5	Método com isca	Não identificada
F.211	*Tapinoma melanocephalum*	Novembro 2010 (5)	Quarto paciente de numero 5	Método com isca	Não identificada
F.215	*Tapinoma melanocephalum*	Novembro 2010 (6)	Porta sala multiuso para solarium	Coleta manual	Não identificada
F.222	*Tapinoma melanocephalum*	Novembro 2010 (6)	Porta sala multiuso para solarium	Método com isca	Não identificada
F.233	*Tapinoma melanocephalum*	Novembro 2010 (6)	Copo paciente quarto 6	Coleta manual	*M. parafortuitum*

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos as espécies de formigas que ocorrem na área urbana foram alvos de inúmeras pesquisas. O maior interesse dos pesquisadores foi avaliar a capacidade destas em atuar como vetores de agentes patogênicos, em diferentes ambientes, entre eles, o ambiente hospitalar (FOWLER et al., 1993; BUENO e FOWLER, 1994; DELABIE et al., 2002, MOREIRA et al., 2005; FONTANA et al., 2010; RODOVALHO et al., 2007).

O interesse de pesquisadores no assunto reflete a preocupação do risco potencial para a saúde pública, que a disseminação destes animais pode provocar nos ambientes hospitalares, a grande mobilidade de algumas espécies (200m a partir do ninho, e velocidade de até 3cm/s), são características que favorecem a disseminação de patógenos.

As investigações sobre formigas nos ambientes hospitalares concluem que elas são potenciais vetores mecânicos de bactérias patogênicas, sendo responsáveis por 1 a 2% das infecções nosocomiais (FOWLER et al., 1995; DELABIE et al, 1995; ZARZUELA, 2002; MOREIRA et al, 2005; RODOVALHO et al., 2007; MAIA et al., 2009).

As bactérias comumente isoladas de formigas em ambientes hospitalares são: *Staphylococcus, Pseudomonas, Enterobacter, Escherichia* e outros bacilos tanto gram positivos como gram negativos (FOWLER et al, 1993; ZARZUELA et al., 2002; CINTRA, 2006; MOREIRA et al., 2005; COSTA et al., 2006a; RODOVALHO et al., 2007; SANTOS et. al. 2009).

Um único estudo avaliou o potencial de formigas como vetores de micobactérias. Esta pesquisa coletou formigas em laboratórios de diagnóstico de

tuberculose humana e animal, isolando em quatro formigas da espécie *Paratrechina longicornis* (formiga louca), três micobactérias das espécies: *M. fortuitum-peregrinum, M smegmatis* e *M. tuberculosis* (ROXO et al, 2010).

Os resultados desta pesquisa foram determinantes na demonstração do potencial de formigas como vetores mecânicos de micobactérias em hospital especializado no atendimento de pacientes com tuberculose.

O hospital selecionado é um dos únicos na rede estadual de São Paulo, que interna os pacientes em tratamento para a tuberculose. Os pacientes internados, em sua maioria, são moradores de rua com estado de saúde debilitado, decorrente não só de seus hábitos de vida, bem como pela presença da doença, muitas vezes diagnosticada em estágios avançados.

Ambientes hospitalares favorecem a disseminação de infecções. A presença de vetores mecânicos colabora para a disseminação dos microorganismos responsáveis por estas infecções. Hospitais, como o escolhido, em que os pacientes apresentam a saúde debilitada devido à tuberculose, as infecções secundárias podem se instalar e agravar o seu estado geral.

No início deste estudo, em uma visita prévia, realizada em meados de 2007, o hospital encontrava-se em estado de conservação precário e as formigas disseminadas por todos os ambientes, sendo constatadas trilhas em frestas de porta, pisos e parede, nas janelas e nos azulejos dos banheiros, além de inúmeros oríficos de acesso aos ninhos.

Foram coletadas 247 formigas, destas 73 coletadas no primeiro ano, 2009 e 174 coletadas no ano de 2010. A diferença entre as coletas provavelmente foram

influenciadas pela reforma do hospital que dificultou, em um primeiro momento, a disseminação destes artrópodes.

O Hospital não adotou nenhuma medida direcionada a prevenção destes artrópodes, e isto influenciou o retorno das formigas ao ambiente, somado a condições favoráveis, como a presença de alimentos, que colaboraram para atrair os insetos

As espécies de formigas coletadas no Hospital pertenciam a quatro espécies: *T. melanocephalum*, *Dorymyrmex* sp., *Pheidole* sp., e *Camponotos* sp. Estas mesmas espécies encontradas foram descritas em estudos anteriores que avaliaram formigas em ambientes hospitalares no Brasil (FOWLER et al., 1993; DELABIE et al., 1995; BUENO e CAMPOS-FARINHA, 1999; ZARZUELA et al., 2002; CINTRA, 2006).

A biodiversidade de formigas estabelecidas em ambientes hospitalares brasileiros é alta quando comparada aos hospitais de clima temperado como nos Estados Unidos, países da Europa e Chile (FOWLER et al., 1993, ZARZUELA et al., 2002; MAIA et al., 2009; BRAGANÇA e LIMA, 2010)

As espécies de formigas coletadas no hospital escolhido pertencem as três subfamílias apontadas como as de maior frequência nestes ambientes: Dolichoderinae,que inclui espécies do gênero *Dorymyrmex* e *Tapinoma melanocephalum*; Formicinae, que inclui espécies do gênero *Camponotos* e Myrmicinae que inclui espécies do gênero *Pheidole* (MAIA et al, 2009).

As formigas da espécie *Tapinoma melanocephalum* (formiga fantasma) foram as mais prevalentes neste estudo, concordando com os resultados de outras pesquisas em ambientes hospitalares (FREITAS e TEIXEIRA, 2007; FOWLER E

BUENO, 1998; ZARZUELA et al., 2002; MOREIRA et. al., 2005; LISE et al., 2006; GUERRA e CONCEIÇÃO, 2010; TANAKA et al, 2007).

A espécie é considerada invasora, oriunda da África ocidental, e muito bem adaptada aos trópicos, principalmente nas cidades da região sudeste do Brasil. Levantamentos em hospitais de pequeno, médio, e grande porte, caracterizam esta espécie como a mais prevalente (FOWLER et al., 1993; BUENO e CAMPOS-FARINHA, 1999).

Especialistas em himenópteros são unânimes em afirmar que as espécies invasoras, quando bem adaptadas, deslocam as formigas nativas e predominam no ambiente. Consideração coerente com os nossos dados, pela ocorrência maciça de *T. melanocephalum* (DELABIE et al., 1995; FREITAS e TEIXEIRA, 2007; CINTRA-SOCOLOWSKI, 2007).

Algumas características de *T. melanocephalum*, denominada também de formiga fantasma, favorecem a sua disseminação, entre elas:

- tamanho relativamente pequeno,
- coloração que dificulta a sua percepção, com cabeça e mesossoma escuros, pernas, gaster e antenas amarelo claros;
- colônias com várias rainhas e um grande número de operárias;
- ninhos pouco organizados, facilitando a instalação em áreas pequenas;
- hábitos alimentares muito semelhantes aos hábitos humanos e
- mobilidade de 200m a partir do ninho, e velocidade de 3 cm por segundo (NICKERSON et. al, 2004; FREITAS E TEIXEIRA, 2007).

Esta espécie ainda apresenta mais uma singularidade, inseticidas à base de piretróides utilizados para outras pragas, como as baratas, colaboram para a disseminação desta espécie por promover a fragmentação de seus ninhos e assim a sua disseminação (CAMPOS-FARINHA, 2004).

Uma particularidade interessante desta espécie é a assiduidade em espaços bem conservados, e estes não impedem a sua nidificação, presente em locais pequenos como: atrás de azulejos, guarnições de janelas e batentes de portas (BUENO e CAMPOS-FARINHA, 1998; SOARES et al., 2006)

No hospital escolhido, os ninhos foram encontrados nos locais descritos nos estudos, principalmente nos azulejos dos banheiros dos pacientes, e em orifícios no piso do solarium, próximos aos batentes das portas dos quartos dos pacientes.

A espécie *Dorymyrmex* sp., foi a segunda mais prevalente no hospital. Esta espécie é encontrada freqüentemente na área rural, ou áreas externas no ambiente urbano. Quanto aos seus hábitos alimentares são onívoras e oportunistas, evitando interações agressivas com outras espécies (IOP et. al., 2009). O hospital escolhido, quando construído, localizava-se na área rural. Com o desenvolvimento da cidade, a proximidade com residências e o comércio aumentou, mas ainda mantêm extensos gramados e jardins com árvores. As formigas desta espécie foram obtidas na área externa, no solarium dos pacientes e no refeitório dos funcionários entre os anos de 2009 e 2010.

A espécie do gênero *Camponotos*, (formiga carpinteira) identificada no hospital é característica de edificações com problemas estruturais e de ambientes com oferta de alimentos. As deficiências estruturais possibilitam a construção dos ninhos, e estas observações eram condizentes com a realidade do hospital antes da

reforma. (FOWLER et al., 1993; BUENO e FOWLER, 1994, ZARZUELA et. al., 2002; GONÇALVES et al., 2011). Atualmente, o hospital é bem conservado, o que não justificaria a presença destas formigas. Acredita-se que como estas foram coletadas logo após a reforma (março, julho e outubro de 2009), elas poderiam ser remanescentes do período anterior.

Em relação à espécie *Pheidole* sp. (formiga cabeçuda), coletadas no solarium e no refeitório do hospital no ano de 2009, esta é uma espécie nativa, e que tem como principal característica a poligina, reduzindo a agressividade inter colonial e permitindo seu deslocamento para diferentes repartições dos hospitais, adquirindo bactérias patogênicas, e colaborando para a disseminação de doenças infecto contagiosas neste ambiente (PESQUERO et. al., 2008; ZARZUELA et al., 2002).

As formigas são capazes de manter associações com bactérias, bacilos e fungos (PEREIRA E UENO, 2008). Esta capacidade explica o resultado das nossas culturas para o isolamento de micobactérias, identificando 63 culturas contaminadas, com o crescimento de bactérias capazes de liquefazer o meio de cultura em menos de 48 horas. Os fungos foram observados em 25 cultivos, e em alguns meios houve crescimento conjunto de contaminantes e de fungos.

Uma das maiores dificuldades encontradas no isolamento foi a contaminação dos meios de cultura por *Bacillus* sp. Esta bactéria é encontrada no solo, na água e envolvida em infecções intestinais. As características macroscópicas das culturas em seu desenvolvimento inicial assemelhavam-se as colônias de micobactérias; e a coloração de Ziehl-Neelsen, em muitas amostras, não era conclusiva para a presença de BAAR.

Após quatro dias, as colônias de *Bacillus* sp. difundiam-se por todo o meio de cultura, e adquiriam um aspecto viscoso e brilhante, muito diferente do comportamento das colônias de micobactérias. O crescimento concomitante deste contaminante e de culturas positivas para micobactérias representou um grande desafio.

Como as micobactérias apresentam um crescimento mais lento, quando comparado com outros patógenos, à contaminação instala-se rapidamente, inviabilizando o meio de cultura

Em duas culturas positivas para micobactérias pela coloração de Ziehl-Neelsen, confirmadas no PCR estavam contaminadas por *Bacillus* sp. As técnicas de descontaminação (método de Petroff e repiques sucessivos) empregadas não foram suficientes para obter colônias puras, prejudicando a análise destas micobactérias isoladas quanto à espécie.

Primeiramente, para os meios de cultura com crescimento foram observadas as características macroscópicas das colônias. Culturas com crescimento semelhante ao das micobactérias eram denominadas de suspeitas.

Os métodos de coloração empregados: Ziehl-Neelsen, Auramina O, e Gram foram adequados para uma triagem inicial de colônias suspeitas para o crescimento de micobactérias. Esta etapa possibilitou selecionar culturas que foram submetidas a PCR para confirmar se pertenciam ao gênero *Mycobacterium*, direcionando as análises.

As identificações bioquímicas relacionadas ao tempo de crescimento e a produção de pigmento auxiliaram na identificação das espécies de micobactérias isoladas de formigas.

Todas as micobactérias isoladas foram identificadas como de crescimento rápido, que podem ou não ser patogênicas ao homem.

Com a utilização de métodos moleculares, avaliações duvidosas foram esclarecidas.

Foram avaliadas pela PCR, 15 culturas consideradas positivas pelos métodos de coloração, e 12 pertenciam ao gênero *Mycobacterium*.

As três culturas negativas na PCR foram equivocadamente consideradas positivas nas avaliações iniciais. Os métodos de coloração, avaliação de crescimento e avaliações macroscópicas identificaram possíveis culturas positivas. Estas metodologias não devem ser as únicas empregadas, pois não são conclusivas.

Das doze culturas positivas para o gênero *Mycobacterium*, nove foram coletadas nas áreas de convívio dos pacientes como: quartos, banheiro, solarium e sala multiuso e três culturas coletadas em áreas sem convívio dos pacientes como: áreas externas, e áreas internas do hospital próximas a portas de saída.

A espécie *T. melanochepalum* encontrada em maior número neste estudo, caracteriza-se por ser uma espécie invasora. Esta espécie é originária da África Ocidental, sendo amplamente disseminada em regiões tropicais e subtropicais. Esta espécie é descrita como a de maior prevalência em diferentes ambientes, entre eles hospitais, bem como é considerada vetor mecânico de agentes patogênicos como: *Staphylococcus, Serratia, Klebsiella, Acinetobacter, Enterobacter, Candida* e *Enterococ*cus (FOWLER et al., 1993; ZARZUELA et al., 2002; NICKERSON et al., 2004; MOREIRA et al., 2005; COSTA et al., 2006a; TEIXEIRA et al., 2009)

Todas estas espécies de formigas encontradas neste estudo foram descritas anteriormente em ambientes hospitalares e consideradas vetores mecânicos de

bactérias patogênicas (ZARZUELA et al., 2002; COSTA et al., 2006a; RODOVALHO et al., 2007; MAIA et al., 2009; FONSECA et al., 2010). Estas espécies também poderão ser consideradas vetores mecânicos de micobactérias em ambientes hospitalares no presente estudo.

Para a determinação das espécies de micobactérias isoladas foi utilizado o método de PRA-*hsp65*, adotado como rotina em laboratórios de identificação de micobactérias, e o sequenciamento genético do DNA das culturas para confirmar as espécies identificadas pelo PRA. As avaliações moleculares são mais precisas que as avaliações bioquímicas, porque estas podem produzir resultados inconclusivos, principalmente, para micobactérias de crescimento rápido.

As metodologias moleculares permitiram identificar quatro espécies de micobactérias.

Foram avaliadas dez culturas de micobactérias, destas, três foram identificadas pelo PRA e confirmadas no sequenciamento genético.

As espécies identificadas pelo PRA e confirmadas no sequenciamento foram:

- uma espécie *M. murale* (F.21),
- e duas espécies *M. chelonae* (F.184 e F.185).

Para o sequenciamento do DNA das culturas de micobactérias foram adotados alguns critérios:

Para o gene *hsp65*, a espécie foi considerada identificada quando a identidade com a cepa padrão foi igual ou superior a 97% (MACNABB et al., 2004).

Para o gene *rpoB*, a identificação quanto a espécie foi considerada quando os valores de identidade foram superiores a 98% com a cepa padrão da espécie (ADEKAMBI et al., 2006).

Para o gene 16S (com 500 pares de bases seqüenciados), a identificação quanto a espécie foi considerada quando os valores de identidade foram superiores a 99% com a cepa padrão da espécie (TORTOLI, 2010).

A partir da análise conjunta dos resultados obtidos com o sequenciamento dos três alvos empregados foi possível determinar:

- amostra F.21 identificada como provável espécie *M. murale*. A probabilidade de a amostra ser desta espécie foi considerada alta. No alvo *hsp* a identidade com *M. murale* (CIP 105980) foi de *98,5%*. No alvo *rpoB*, apesar da identidade para a espécie ser menor que o critério adotado (97,64% *M. murale* (CIP 105980), foi muito próximo a ele. E para o alvo 16S 500, a identidade para espécie também foi abaixo do critério (98,4% *M. murale* CCUG 39728), mais próximo a ele;

- amostra F.27 não foi identificada. Em todos os alvos empregados à identidade obtida foi menor que o critério adotado. Como a identidade em todos os alvos foi muito baixa, isto é sugestivo de uma nova espécie, mas como só uma amostra foi isolada com esta característica, a hipótese foi desconsiderada;

- amostra F.184 e a amostra F.185 foram identificadas como *M. chelonae*. Nestas duas amostras a identidade nos três alvos foram superiores aos critérios adotados. Na amostra F.184, 100% de identidade com a cepa padrão (AM 902969.1) para o alvo *hsp*, 100% com a cepa padrão (JCM 6388) para o alvo 16S 500 e 99,4% com a cepa padrão (EU 1092881.1) para o alvo *rpoB*. A amostra F.185 obteve identidade de 100% nos três alvos, para as mesmas cepas. O alvo 16S não é o mais adequado na identificação da espécie *M. chelonae*, mas foi utilizado para padronizar a metodologia;

-amostra F.99, amostra F.210, amostra F.211 e amostra F.215 não foram identificadas. As identidades apresentadas para os três alvos foram baixas, mas os valores idênticos.

Estas amostras, com resultados baixos e idênticos no sequenciamento genético do DNA nos três alvos empregados indicam uma nova espécie.

Para que a identificação de uma nova espécie seja realizada, faz-se necessário, no mínimo, três isolamentos distintos. Esta pesquisa isolou quatro amostras distintas, obtidas de formigas diferentes, mas com culturas macroscopicamente semelhantes, e que apresentaram as mesmas características genéticas quando avaliadas para o PRA-*hsp* e para o sequenciamento genético do DNA. Para confirmar esta nova espécie seriam necessários, estudos mais detalhados.

A amostra F.222 não foi identificada. No alvo *hsp* a identidade foi de 100% com a cepa padrão da espécie *M. doricum* (DSM44339). No alvo *rpoB*, a identidade foi baixa, e para 16S 500, a amostra foi identificada como uma bactéria não cultivável presente em solos. Este resultado não foi considerado. Uma proposta seria sequênciar a cepa padrão de *M. doricum* e compará-la com a sequência de 16S da bactéria não cultivável para averiguar se existe alguma similaridade.

A amostra F.233 foi identificada como provável *M. parafortuitum*, por ter apresentado identificação alta no alvo 16S 500, considerado padrão ouro para o sequenciamento genético. Nesta amostra, os resultados poderiam ser mais detalhados, como sequênciar o alvo 16S inteiro para *M. parafortuitum*, e compará-lo com a amostra.

Com o genoma das micobactérias, inúmeros alvos foram detectados e estes poderiam ser utilizadas na sua identificação. Um deles, o gene 16 S é considerado

alvo de primeira escolha, sequenciando todo o genoma da micobactéria. Uma alternativa a este alvo seria o gene *hsp*-65, com 440 pares de base. Outros alvos podem ser utilizados, entre eles o *rpoB*, para micobactérias de crescimento rápido.

A avaliação da sequência genética da amostra não depende apenas da escolha de um bom alvo, os resultados do sequenciamento devem ser comparados a sequencias de nucleotídeos presentes em bancos de dados. Mas estes bancos nem sempre mantêm informações atualizadas, ou de fontes fidedignas, acarretando em erros na identificação das espécies (TORTOLI., 2010). Além disso, a aplicação de valores estritamente matemáticos em relação à identidade com a cepa padrão em entidades biológicas é questionável. Em relação às micobactérias, 50% são consideradas espécies distintas, mas apresenta semelhança genética superior a 99% com uma ou mais espécies do gênero. (TORTOLI, 2010). Neste estudo, uma das principais dificuldades foi à ausência de cepas padrão de fontes confiáveis depositadas no banco de dados, restringindo a nossa análise e justificando falta de identificação de algumas espécies isoladas nesta pesquisa.

As arvores filogenéticas realizadas compararam a sequência genética das amostras de micobactérias isoladas no hospital com a cepa padrão da espécie identificada. As espécies avaliadas foram *M. chelonae* e *M. murale*. E as árvores demonstraram a similaridade entre a cepa isolada e a cepa padrão das espécies.

Atualmente, pertencem ao gênero *Mycobacterium* cerca de 150 espécies identificadas, sabe-se que este número deve aumentar com os avanços das tecnologias moleculares, principalmente as de crescimento rápido.

As micobactérias de crescimento rápido são amplamente distribuídas no ambiente, seu potencial como agentes de infecção foi descoberto nos anos 50 do

século passado, mas recentemente o aumento de surtos com estes patógenos alertou para o enorme problema que infecções por estas espécies podem representar (FONTANA, 2008; PITOMBO et al, 2009).

Esta pesquisa isolou de formigas micobactérias de crescimento rápido, comprovadas pelos métodos de coloração, PCR para o gênero *Mycobacterium*, identificação da espécie pelo PRA-*hsp65* e sequenciamento genético do DNA.

Foram identificadas quatro culturas sugerindo uma nova espécie de micobactéria, duas culturas com a presença de uma micobactéria patogênica ao homem *(M. chelonae*), e uma cultura com uma espécie de micobacteria não patogênica, mas vinculada a contaminação de sistemas de filtro de água em uma creche.

M. murale é uma micobactéria saprófita, escotocromogênica, e recentemente descrita como maior colonizador bacteriano de paredes internas de filtro de água em creche (VUORIO et.al., 1999). Esta espécie foi isolada em uma formiga da espécie *Pheidole* sp., coletada no solarium dos pacientes do hospital

As micobactérias da espécie *M chelonae* são acromógenas e consideradas patogênicas para o homem, com capacidade de se manter viável e multiplicar-se por no mínimo 30 dias em água destilada a 25C. Ambientes úmidos favorecem a sua presença (PITOMBO et. al., 2009).

É responsável por infecções cutâneas, incluindo infecções pós-cirúrgicas; infecções profundas ou doenças disseminadas em hospedeiros imunocomprometidos como imunocompetentes. E descrita em infecções nosocomiais por contaminação de broncoscópios (BROWN-ELLIOT,2002; LEÃO et al., 2009).

Os surtos por micobactérias no Brasil entre 1998 a 2009 foram identificados em diferentes procedimentos cirúrgicos, procedimentos estéticos, inoculação de vacinas e medicamentos, procedimentos executados com endoscópios. Na maior parte destes episódios houve contaminação por micobactérias, devido a falhas nos procedimentos de esterilização. Micobactérias também são descritas como colonizadoras de sistemas de água, biofilmes presentes em soluções saneantes e desinfetantes, colaborando para a disseminação de infecções nosocomiais (FONTANA, 2008; PITOMBO et al., 2009; DUARTE et al., 2009; LEÃO et al, 2010; ANVISA, 2011).

Investigações realizadas pela ANVISA denunciaram a ocorrência de infecção hospitalar por *Mycobacterium abscessus/chelonae/fortuitum*, através de procedimentos invasivos, na maioria do tipo: endoscopias, broncoscopias, laringoscopias, entre outros procedimentos utilizando endoscópios (FONTANA, 2008; ANVISA, 2011).

Embora não represente alta mortalidade, estas infecções denotam um impacto significante na saúde pública, exigindo medidas de prevenção articuladas envolvendo secretarias de saúde, administrações hospitalares, laboratórios, pacientes, profissionais de saúde e outros envolvidos com a área (FONTANA, 2008; ANVISA, 2011).

As espécies *M. fortuitum*, *M. abscessus* e *M. chelonae* estão relacionadas a doenças de pele e do tecido subcutâneo e decorrente de procedimentos hospitalares ou cirurgias. Caracterizam-se por abscesso piogêncios, com supuração. A evolução do caso é determinada por uma inflamação crônica, progressiva, com formação de nódulos e fistulação. A ausência de respostas para as terapias antibióticas

convencionais, empregadas em infecções cutâneas indica a presença destes patógenos (ANVISA, 2007; FONTANA, 2008).

A espécie *M. chelonae* foi isolada em duas formigas coletadas na tampa do vaso sanitário do banheiro dos pacientes. A proximidade dos pacientes com formigas que transportavam um agente potencialmente patogênico ressalta a preocupação com o risco potencial destes artrópodes como vetores mecânicos, considerando a sua capacidade de locomoção.

No banheiro em que estas formigas foram coletadas, a sua presença foi intensa. Neste ambiente foram coletadas 61 formigas, correspondendo a maior coleta em ambientes com convívio de pacientes.

Os pacientes do hospital relataram durante as coletas, que à noite, a tampa do vaso ficava cheia de formigas. A presença destas foi detectada em escarros, no chão, na pia e nos azulejos, verificou-se a presença de trilhas nas paredes e de ninhos no rejunte dos azulejos.

A espécie *M. chelonae* já foi responsável por um surto de infecção após injeção de Penicilina. As investigações concluíram que as micobactérias encontravam-se na tampa do frasco do medicamento e eram injetadas na solução ao serem preparadas. Como esta espécie era resistente ao antibiótico, cresciam lentamente no local onde a medicação era injetada, promovendo a infecção (ZHIBANG et al, 2002; FONTANA, 2008). Este estudo comprova a facilidade de contaminação de objetos por micobactérias facilitando a sua transmissão ao homem.

A pouca aversão das pessoas a estes artrópodes possibilita que transitem em diferentes ambientes, podendo contaminar-se no banheiro e transportar o agente em seu corpo até enfermarias, centros cirúrgicos, refeitórios, entre outros.

Identificar a espécie de micobactéria envolvida em um surto se faz importante porque muitas são resistentes a antibióticos.

Estes resultados confirmam o potencial destes artrópodes como vetor mecânico de micobactérias, podendo veicular micobactérias patogênicas ao homem.

A dificuldade de eliminar estes artrópodes do ambiente hospitalar é um dos maiores desafios no controle de infecções hospitalares. Para um controle eficaz, as espécies de formigas presentes no ambiente devem ser identificadas, e as ações direcionadas às características destas, mas dificilmente isto é realizado.

A grande diversidade de espécies no Brasil, a ampla disseminação nos hospitais e o envolvimento cada vez maior destas espécies no transporte de diferentes agentes patogênicos devem ser considerados como um dos maiores desafios no controle de infecções hospitalares.

As medidas de prevenção só serão eficazes quando primeiramente a classe médica e os profissionais de saúde, conscientizarem-se do problema para a saúde pública que a presença de formigas em hospitais representa.

7 CONCLUSÕES

- As formigas são vetores mecânicos de micobactérias em ambiente hospitalar.
- No hospital selecionado foram detectadas quatro espécies de formigas.
- A formiga fantasma foi à espécie predominante *(Tapinoma melanocephalum)* no ambiente hospitalar.
- As formigas estavam disseminadas em todos os ambientes do hospital selecionado.
- As micobactérias isoladas em formigas neste trabalho eram de crescimento rápido, com espécies patogênicas e não patogênicas ao homem.
- Foram isoladas micobactérias patogênicas *(M. chelonae)* e uma possível nova espécie de micobactérias em *Tapinoma melanocephalum*.
- A contaminação de fômites deve ser considerada, já que formigas foram coletadas de copos de pacientes, e circulam por todos os ambientes.
- Os surtos no Brasil envolvendo micobactérias de crescimento rápido são preocupantes em ambientes com a presença concomitante de formigas e de micobactérias patogênicas.

- A pouca importância dada a associação de formigas com a transmissão de doenças é um dos principais obstáculos para seu controle e prevenção, principalmente dos profissionais de saúde.

8 REFERÊNCIAS

Abrahão RMCM. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 1998.

Adekambi T, Colson P, Drancourt, M. *Rpob*-Based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. Journal of Clinical Microbiology. 2003;41:5699-5708.

Adekambi T, Berger P, Raoult D, et al. Rpob Gene Sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium Bolletii sp*. nov., *Mycobacterium Phocaicum sp.* nov. and *Mycobacterium Aubagnense sp.* nov. International Journal of systematic and evolutionary microbiology. 2006;56:133-143.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Micobactérias. Nota Técnica. 2008.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Relatório descrito de investigação de casos de infecções por micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido (MCR) no Brasil no período de 1998 a 2009. Unidade De Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos. 2011. p.56.

Altschul SF, Gish W, Miller W et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403-410.

Barreto AMW, Campos, CED. Micobactérias “não tuberculosas” no Brasil. Bol Pneumol Sanit. 2000;8(1):23-32.

Beatson Sh. Pharaoh’s Ants as pathogens vectors in hospitals. Lancet. 1972;1:425-427.

BIER, O. Micobactérias. In: _____ Bacteriologia e imunologia. 19 ed. São Paulo: Melhoramentos, 1978. p. 585-610.

Blackwood KS, He C, Gunton J, et al. Evaluation of recA sequences for identification of mycobacterius species. J Clin Microbiol. 2000;38:2846–2852.

Bragança MAL, Lima DL. Composição, abundância e índice de infestação de espécies de formigas em um hospital materno-infantil de Palmas, TO. Neotropical Entomology. 2010;39:124-130.

Brito AC. Estudo fenotípico e molecular de micobactérias de crescimento rápido de interesse a Saúde Publica. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2008.

Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, et al. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. Proccedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.2002;99(6): 3684-3689.

Brown-Elliott B, Wallace RJ. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. Clinical Microbiology Reviews. 2002;15:716-746.

Bueno OC, Campos-Farinha AEC. Formigas Urbanas: comportamento das espécies que invadem as cidades brasileiras. Vetores & Pragas. 1998,1:13-16.

Bueno OC, Campos-Farinha AEC. Formigas urbanas: estratégias de controle. Vetores & Pragas, 1999 , 2:5-7.

Bueno OC, Fowler HG. Exotic ants and native ant fauna of brasilian hospitais. In: Williams DF. (Ed.). Exotic ants: biology, impact, and control of introduced species. Boulder: Westview Press, 1994. p. 191-198.

Bum-Joo K, Keun-Hwa L, Bo-Na P, et al. Differentiation of mycobacteria species by PCR retriction analysis of DNA (342 bases pairs) of the RNA polymerase gene(*rpoB*). Journal of Cinical Microbiology. 2001;39(6):2102-2109.

Caliari JS, Figueiredo RM. Perfil de pacientes com tuberculose internados em hospital especializado no Brasil. Rev Panam Infectol. 2007;9(4):30-35.

Campos-Farinha, AEC, Bueno OC, Campos MGC, Kato LM. As formigas urbanas no Brasil: Retrospecto. Arquivos do Instituto Biológico. 2002;64:129-133.

Campos-Farinha AEC; Bueno OC. Formigas urbanas: comportamento e controle. O Biológico. 2004;66(1/2):47-48.

Campos-Farinha, AEC. Urban pest ants of Brazil (Hymenoptera: Formicidae) In: Proceedings of the Fifth International Conference on Urban Pests. 2005; Cingapura, SG. Malasia: Perniagaan Ph'ng; 2005. p. 1-4.

Carneiro LC, Carvalhares TT, Pesquero, MA, et al. Identificação de bactérias causadoras de infecção hospitalar e avaliação da tolerância a antibióticos. Newslab. 2008;86:106-114.

Cintra, P. Formigas em ambientes hospitalares: associação com bactérias (patogênicas e endosimbiontes) e modelo de controle. [Tese de Doutorado]. Rio Claro: Instituto de Biociências da UNESP; 2006.

Cintra-Socolowski, P. Histórico sobre as pesquisas com formigas em ambientes hospitalares no Brasil. O Biológico. 2007;69(2):35-38.

Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SY, et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. BMC Microbiol. 2008;8:48.

Cook VJ, Turenne CY, Wolfe J, et al. Conventional methods versus 16 S ribosomal DNA sequencing for identification of non-tuberculous mycobacteria: cost analysis. Journal of Clinical Microbiology. 2003;41(3):1010-1015.

Corner LA. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Veterinary Microbiology.1994;40:53-63.

Costa HCG, Malaspina AC, Mello FAF, et al. Ocorrência de tuberculose em um hospital psiquiátrico do interior de Goiás. Jornal Brasileiro de Pneumologia. 2006a;32(6):566-572.

Costa SB, Pelli A, Carvalho GP, et al. Formigas como vetores mecânicos de microorganismos no hospital escola da universidade federal do triângulo mineiro. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2006b;39(6):527-529.

Costa ARF, Lopes ML, Furlaneto IP, et al. Molecular identification of nontuberculous mycobacteria isolates in a brazilian mycobacteria reference laboratory. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2010a;68:390-394.

Costa EM, Filgueira MA, Oliveira FL, et al. Estudos preliminares sobre a mirmecofauna urbana de Mossoró-Rn: identificação dos gêneros. Revista Verde. 2010;5:151-156.

Delabie JHCD, Nascimento IC, Pacheco P, et al. Community structure of house-infesting ants (Hymenoptera: Formicidae) in southern Bahia, Brazil. Florida Entomologysty. 1995;78(2):264-268.

Delabie JHCD, Fontana R, Brito TA, et al. Infecção hospitalar e formigas no Brasil: o caso de um hospital no sudeste da Bahia. O Biológico. 2002;64(1):41-42.

Duarte RS, Lourenço MCS, Fonseca LS, et al. Epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium Massiliense*. Journal of Clinical Microbiology. 2009;47(7):2149-2155.

Edwards JP, Baker LF. Distribution and importance of the pharaoh's monomorium pharaonis (l) in national health service hospitals in England. Journal of Hospital Infection. 1981;2:245-254.

Edwards JP. The biology, economic importance and control of the pharaoh's ant, *monomorium pharaonis*. In:Vinson, S.B.(Ed.). Economic impact and control of social insects. New York: Praeger Press, 1986;257-271.

Eichler W. Health aspects and control of monomorium pharaonis. In: Meer, V. et al. (Ed.) Applied myrmecology: a world pesperctive. Boulder: Westview Press. 1990;671-675.

Ferraboli R, Nakano V, Leoni LAB, et al. Formigas (Hymenoptera: Formicidae) como hospedeiro paratênicos de bactérias e parasitas. Revista Integração. 2007;13(51):353-356.

Figueiredo RM, Caliari JS. Tuberculose nosocomial e risco ocupacional: o conhecimento produzido no Brasil. Rev Cienc Med.2006;15(4):333-338.

Fonseca AR, Batista DR, Amaral DPA, et al. Formigas (Hymenoptera: Formicidae) urbanas em um hospital no município de Luz, estado de Minas Gerais. Acta Scientiarum. Health Sciences. 2010;32(1):29-34.

Fontana RT. As micobactérias de crescimento rápido e a infecção hospitalar: um problema de saúde pública. Revista Brasileira de Enfermagem.2008;61(3):371-376.

Fontana R, Wetler, RMC, Auino, RSS, et al. Disseminação de bactérias patogênicas por formigas (Hymenoptera: Formicidae) em dois hospitais do nordeste do Brasil Neotropical Entomology. 2010;39(4):655-663.

Fowler HG. Bueno, OC, Sadatsune T, et al. Ants as potencial vectors of pathogens in Brazil hospitals in the state of São Paulo, Brazil. Insect Science and its Application.1993;14:367-370.

Fowler HG; Anaruma Filho; Bueno OC. Formigas nos hospitais. Ciência Hoje.1995;19(11):12-13.

Fowler HG, Bueno OC. O avanço das formigas urbanas. Ciência Hoje.1998:23(137):71-73.

Franco C, Zanetta DCM. Tuberculose em profissionais da saúde: medidas institucionais de prevenção e controle. Arquivos Ciências da Saúde. 2004;11(4):244-252.

Freitas MR, Teixeira IRV. A formiga fantasma (*Tapinoma Melanocephalum*) domina os ambientes hospitalares em Guaxupé, MG. In: Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil. 2007; Caxambu, BR. São Paulo: Sociedade de ecologia do Brasil, 2007. p.1-2.

Fisher O, Matlova L, Dvorska L, et al. Diptera as vectors of mycobacterial infection in cattle and pigs. Medical and Veterinary Entomology. 2001;15(2):208-211.

Fisher O, Matlova L, Dvorska L, et al. Nymphs of the oriental cockroach (*Blatta orientalis*) as passive vectors of causal agents of avian tuberculosis and paratuberculosis. Medical and Veterinary Entomology. 2003;17(2):145-150.

Garcia FRM, Ahlert CC, Freitas BR, et al. Ants (Hymenoptera: Formicidae) in five hospitals of Porto Alegre, Rio Grande do Sul State, Brazil. Acta Scientiarum Health Sciences. 2011;33(2):203-209.

Galesi VMN. Dados de tuberculose do estado de São Paulo. Revista Saúde Pública. 2007;41(1):121.

Gonçalves MG, Loeck AE, Silva EJE, et al. Associação entre formigas (Hymenoptera: Formicidae) e bactérias patogênicas em cinco hospitais do município de Pelotas, RS. Arquivos do Instituto Biológico. 2011;78 (2):287-295.

Gonçalves MLC. Transmissão nosocomial da tuberculose: diminuindo o risco. Boletim de Pneumologia Sanitária. 2001;9(2).

Guerra, SF, Conceição DM. Formigas carregadoras de bactérias no abrigo São Vicente de Paulo. In: Anais do primeiro seminário de iniciação cientifica docente e discente das Faculdades da Anhanguera. 2011; Leme, BR. Leme: Faculdade da Anhanguera; 2010. p. 45-51.

Guilarde AO, Turchi MD, Turchi CM, et al. Bacteremias em pacientes internados em universitário. Revista Associação Médica Brasileira. 2007;53(1):34-38.

Gusmão FA, Sibinel N, Campos-Farinha AEC. Distribuição de formigas urbanas no prédio central do Instituto Biológico. O Biológico. 2007;69(2):455-457.

Hall

Iop S, Caldart VM, Lutinski JA, et al. Formigas urbanas na cidade de Xanxerê, Santa Catarina, Brasil. Revista Biotemas. 2009;22(2):55-64.

Ipinza-Regla J, Figueroa G, Osorio J. Iridomyrmex humilis 'hormiga argentina', como vector de infecciones intrahospitalarias: in estudio bacteriologico. Folia Entomol Mex.1981;50:81-96.

Jaffé K, Caetano FH, Sanches P, et al. Sensivity of ant (Cephalotes) colonies and individuals to antibiotics implies feeding symbiosis with gutmicroorganisms. Canadian Journal of Zoology, 2001; 79(6):1120-1124.

Khan IU, Selvaraju SB, Yadav JS. Method for rapid identification and differentiation of the species of the Mycobacterium chelonae complex based on 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer PCR restriction analysis. Journal of Clinical Microbiology. 2005;43:4466–4472.

Leão SC, Briones MRS, SircilliMP et al. Identificcation of two npvel Mycobacterium avium allelic variants in pig and human isolates from brazil by Pcr restriction enzyme analysis. Journal of Clinical Microbiology.1999;37(8):2592-2597.

Leão SC, Tortoli E, Viana-Niero C, et al. Characterization of mycobacteria from a major brazilian outbreak suggests that revision of the taxonomic status of members of the *Mycobacterium chelonae-M. abscessus* Group is needed. Journal of Clinical Microbiology. 2009;47(9):2691-2698.

Leão SC, Viana-Niero CE, Matsumoto C et al. Epidemic of surgical-site infections by a single clone of rapidly-growing mycobacteria in Brazil Future Microbiol .2010; 5(6):971-980.

Lee AS, Jelfs P, SintchenkoV, et al. Identification of non-tuberculous mycobacteria: utility of the GenoType Mycobacterium CM/AS assay compared with HPLC and 16S rRNA gene sequencing. Journal of Medical Microbiology. 2009;58: 900–904.

Leser W, Barbosa V, Barussi, RG et al. Elementos da epidemiologia geral.São Paulo: Editora Atheneu, 2000.

Levin AS, Leite OHM, Dias MBS, et al. (coord.). Normas para o diagnóstico, tratamento e prevenção da tuberculose. In: Manual de Tuberculose São Paulo: Hospital das Clinicas FMUSP; 2006. 54 p.

Lise, F, Garcia, FRM, Lutinski, JA. Association of ants (Hymenoptera: Formicidae) with bacteria in hospitals in the state of Santa Catarina. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2006;39(6):523-526.

Lorena NOS, Duarte RS, Pitombo MB. Infecção por micobactérias de crescimento rápido após procedimentos videocirúrgicos - a hipótese do glutaraldeído. Rev Col Bras Cir. 2009;36(3):266-267.

Macedo JLS, Henriques CMP. Infecções pós-operatórias por micobactérias de crescimento rápido no Brasil. Rev Bras Cir Plást. 2009;24(4):544-551.

Maia, ZPG; Gusmão, AB; Barros, T F. formigas como fator de risco para infecções nosocomiais. Revista Saúde e Biologia. 2009;4(2):47-51.

Manual Merck. Tuberculose. Portugal, PT; 2009. Seção 17, capítulo 181.

Matsumoto CK, Chimara E, Souza CWO, et al. Surto de infecção pós-vacinação por *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* na cidade de Andradina (SP) In: Anais XXV Congresso Brasileiro de Microbiologia, Porto de Galinha, PE 8-12 nov. 2009. Resumo ID:469-1.

McIntyre NE. Ecology of Urban Arthropods: A Review and a Call to Action. Annals of the Entomological Society of America. 2000;93(4):825-835.

Mcnabb A; Eisler D, Adie K, et al. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene *(hsp65)* for routine identification of mycobacterium species isolated from clinical sources. Journal of Clinical Microbiology. 2004;42(7):3000-3011.

Mimica I, Mimica LMJ, Pianto JE, et al. Vetores animais e sua provável importância na transmissão de 91 infecções intra-hospitalares. In: Anais do Hospital da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**.** São Paulo; 1984.

Ministério da Saúde (BR), Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Manual de Microbiologia Clinica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2004.

Ministério da Saúde (BR), Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Segurança e controle de qualidade no laboratório de microbiologia clínica. Mod. II. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2004.

Ministério da Saúde (BR), Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Sistema de Legislação em Vigilância Sanitária. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2007.

Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde, Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de bacteriologia da tuberculose. 3. ed. Rio de Janeiro: Secretaria da Saúde, 2005.

Ministério da Saúde (BR), Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alerta sobre infecções por micobactéria não tuberculosa após vídeocirurgia. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2007.

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. Nota técnica nº 2/DEVEP/SVS/MS. Ocorrência de surto de Infecção por Mycobacterium tuberculosis após cirurgias no Rio de Janeiro (RJ), 2007. Acesso em 20/07/2007. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude.

Ministério da Saúde (BR). Tuberculose. Brasília (DF);2011

Moreira DDO, Morais V, Motta OV, et al.. Ants and carriers of antibiotic-resistant bacteria in hopsitals. Neotropical Entomology. 2005;34(6):999-1006.

Munayaco CV, Grijalva DR, Bolarte JL, et al. Outbreak of persistent cutaneous abscesses due to *Mycobacterium chelonae* after mesotherapy sessions, Lima, Peru. Rev Saúde Pública. 2008;42(1):146-9.

Nickerson JC, Bloomcamp CL, Fasulo TR. Ghost ant, *Tapinoma Melanocephalum* (Fabricius) (Insecta: Hymenoptera: Formicidae). Florida: The Institute of Food And Agricultural Sciences (Ifas) University of Florida; 2004. Disponível em: http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/in/in53200.pdf

Oliveira MF, Campos-Farinha, AEC. Formigas urbanas do município de Maringá, PR, e suas implicações. Arquivos do Instituto Biológico. 2005; 72(1): 33-39.

Pai HH, Chen WC, Peng CF. Isolation of non-tuberculous mycobacteria from hospital cockroaches (*Periplaneta americana*). Journal of Hospital Infection. 2003;53(3):224-228.

Palomino JC, Martin A, Portaels F. New methods for the diagnosis and drug resistance detection in mycobacteria. Recent Research Development in Microbiology. 2002;6:297-318.

Peçanha MP. Formiga como vetor de propagação bacteriana no conjunto hospitalar de Sorocaba – SP. [Tese de Doutorado]. Rio Claro: Instituto de Biociências da UNESP; 2000.

Pereira RS, Ueno M. Formigas como veiculadoras de microorganismos em ambiente hospitalar. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2008;41(5):492-495.

Pesquero MA, Filho JE, Carneiro LC, et al. Formigas em ambiente hospitalar e seu potencial como transmissoras de bactérias. Neotropical Entomology. 2008;37(4):472-476.

Pitombo MB, Lupi O, Duarte RS. Infecções por micobactérias de crescimento rápido resistentes a desinfetantes: uma problemática nacional Rev Bras Ginecol Obstet. 2009;31(11):529-533.

Portugal, I. O binômio HIV/Tuberculose multirresitente. III Congresso Virtual HIV/AIDS. [Palestra na internet] Portugal; 2002. Acesso em 02/07/2011. Disponível em: http://www.aidscongress.net/Modules/WebC_AidsCongress/CommunicationHTML.aspx?Mid=32&CommID=99.

Quirino NEPS. Controle da água e vetores. In: Couto RC, Pedrosa TMG, Nogueira, JM.(Eds.) Infecção hospitalar: Epidemiologia e controle. São Paulo: Medsi, 1987. p. 219-228.

Ringuet H, Akoua-Koffi C, Honore S, et al. *Hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. Journal of clinical microbiology. 1999;37(3):852-857.

Rodovalho CM, Santos AL, Marcolino MT, et al. Urban ants and transportation of nosocomial bacteria. Neotropical Entomology. 2007; 36(3):454-458.

Roth A, Fischer M, Hamid ME, et al. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. J Clin Microbiol. 1998;36:139–147.

Roxo E, Alves MP, Ruggiero APM, et al. Pesquisa de formigas como vetores mecânicos de micobactérias em ambiente laboratorial e ambulatorial em São Paulo. In: Anais XVI Reunião Anual do Instituto Biológico; 2003; São Paulo: Arquivos do Instituto Biológico; 2003. v. 70.

Roxo E, Campos AEC, Alves MP, et al. Ants' role (Hymenoptera: Formicidae) as potential vectors of mycobacteria dispersion. Arquivos do Instituto Biológico. 2010; 77(2):359-362.

Ruggiero APM. Métodos moleculares aplicados ao diagnóstico de tuberculose bovina. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP; 2004.

Ruggiero APM, Ikuno AA, Ferreira VCA, et al. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. Arquivos do Instituto Biológico. 2007;74(1):55-65.

Santos MFS, Della Lucia TMC, Delabie JCH. Formigas hospitalares em Viçosa, MG. In: Anais do XV Encontro de Mirmecologia. 2001; Londrina, BR. Londrina: Instituto Agronômico do Paraná; 2001. p. 113-115.

Santos PF, Fonseca AR, Sanches NM. Formigas (Hymenoptera: Formicidae) como vetores de bactérias em dois hospitais do município de Divinópolis, estado de Minas Gerais. Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2009;42(5):565-569.

Secretaria Estadual da Saúde (SP), Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica Professor Alexandre Vranjac, Divisão de Infecção Hospitalar. Infecções em cirurgia plástica; 2005.

Secretaria Estadual da Saúde (RS), Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Prevenção e controle de infecções por micobactérias não tuberculosa relacionadas a vídeo cirurgia e outros procedimentos invasivos. Nota Técnica Conjunta. 2007;(1).

Severo NPF, Leite CQF, Capela MV, et al. Características clínico-demográficas de pacientes hospitalizados com tuberculose no Brasil, no período de 1994 a 2004. Jornal Brasileiro de Pneumologia. 2007;33(5):565-571.

Schuller L. Microrganismos Patogênicos Veiculados Por Formigas "Andarilhas" Em Unidades De Alimentação. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2004.

Shin S, Kim EC, Yoon JH. Identification of non-tuberculous mycobacteria by sequence analysis of the 16S ribosomal RNA, the heat shock protein 65 and the RNA polymerase β-subunit genes. Korean J Lab Med. 2006;26:153–160.

Tanaka II, Viggiani AMFS, Person OC. Bactérias veiculadas por formigas em ambiente hospitalar. Arquivos Médicos do ABC. 2007;32(2):60-63.

Takewaki S, Okuzumi K, Manabe I, et al. Nucleotide sequence comparison of the mycobacterial dnaJ gene and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacterial species. Int J Syst Bacteriol 1994;44:159–166.

Teixeira MM, Pelli A, Santos VM, et al. Microbiota associated with tramp ants in a brazilian university hospital. Neotropical Entomology. 2009;38(4):537-541.

Telenti A, Marchesi F, Balz M, et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. Journal of clinical microbiology. 1993;31(2):175-178.

Tortoli E. Standard operating procedure for optimal identification of mycobacteria using 16s Rrna gene sequences. Standarts In Genomic Sciences. 2010;3:145-152.

Ueki SYM, Martins MC, Telles MAS, et al. Micobactérias não tuberculosa:diversidade das espécies no estado de São Paulo. J. Bras. Patol. Méd. Lab. 2005;41(1):1-8.

Vuori R, Andemon MA, RaineyFA et al. A new rapidly growing mycobacterial species,*Mycobacterium murale* sp. nov., isolated fromthe indoor walls of a children's day care centre. International Journal of nternational Journal of Systematic Bacteriology. 1999;45: 25-35.

Wetler RMC, Delabie JHC, Fontana R. Isolamento e identificação de bactérias a partir de formigas coletadas no campus da UESC e em um hospital público da cidade de Ilhéus BA. In: Anais XI Seminário de Iniciação Científica, e VIII

Semana de Pesquisa e pós-graduação. 2005; Ilhéus, BR. Ilhéus: Editus; 2005. p. 265-267.

Williams DF. Exotic ants: biology, impact and control of introduced species. Boulder: Westview Press, 1989.

World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2008. Geneva; 2008. Acesso em 05/12/2011. Disponível em: http://www.who.int tb/publications/2008/en/index.html.

Zarzuela MFM, Ribeiro MCC, Campos-Farinha AEC. Distribuição de formigas urbanas em um hospital da região sudeste do Brasil. Arquivos do Instituto Biológico. 2002;69(1): 85-87.

Zarzuela MFM, Campos-Farinha AEC, Peçanha MP. Evaluation of urban ants (Hymenoptera: Formicidae) as carriers of pathogens in residences and industrial Environments. I. Bacteria. Sociobiology. 2005;45(1):9-14.

Zarzuela MFM, Campos-Farinha AEC, Russomano OMR, et al. Evaluation of urban ants (Hymenoptera: Formicidae) as vectors of microorganisms in residencial and industrial environments: II. Fungi. Sociobiology. 2007;50:653-658.

Zhibang Y, BiXia Z, Qishan L, et al. Large-scale outbreak of infection with *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus* after injection Penicillin. J Clin Microbiol. 2002;40(7):2626-28.

ANEXO 1

Planilha para identificação local da coleta de formigas.

Data coleta	Número Formiga	Local da coleta

ANEXO 2

Planilha para controle da leitura dos meios de cultura

Identificação cultura	Meios de cultura				Data leitura
	L-J	L-J	ST	ST	

Legenda:
(-): Sem crescimento; (C): Contaminante; (+): Positivo; (F): Fungo.