

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente  
Laboratório de Parasitologia

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Acanthamoeba* spp. EM SPAS E  
PISCINAS TÉRMICAS LOCALIZADOS EM PORTO ALEGRE, RS - BRASIL.**

Dissertação de Mestrado

Laura Führich Fabres

Porto Alegre, 2014.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente  
Laboratório de Parasitologia

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Acanthamoeba* spp. EM SPAS E  
PISCINAS TÉRMICAS LOCALIZADOS EM PORTO ALEGRE, RS - BRASIL.**

Laura Führich Fabres

Bióloga – UFRGS

Dissertação de Mestrado apresentada  
como um dos pré-requisitos para  
obtenção do grau de Mestre em  
Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Marilise Brittes Rott

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Lisianne Brittes  
Benitez

Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brasil

Agosto de 2014

iii

### CIP - Catalogação na Publicação

Fuhrich Fabres, Laura

Isolamento e Identificação de Acanthamoeba spp. em spas e piscinas térmicas localizados em Porto Alegre, RS - Brasil / Laura Fuhrich Fabres. -- 2014. 79 f.

Orientadora: Marilise Brittes Rott.

Coorientadora: Lisianne Brittes Benitez.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Acanthamoeba. 2. amebas de vida livre. 3. spas. 4. piscinas térmicas. I. Brittes Rott, Marilise, orient. II. Brittes Benitez, Lisianne, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha mãe, Denise, que me educou, ensinou e principalmente me ajudou a alcançar todas as minhas conquistas até hoje: mãe, te amo!

A minha família, que me apoiou e forneceu a base de toda a minha formação.

A minha orientadora, Professora Marilise B. Rott, que me aceitou como orientada com todo o carinho e me passou ensinamentos durante estes dois anos de convivência.

Ao meu noivo, namorado e amigo, Álvaro, que sempre me apoiou e foi companheiro em todos os momentos.

Aos colegas do laboratório de Parasitologia, Lua, Vinicius, Ana Maris, Carla, João, Amanda, Natália, Tais, Keli e Thamires, obrigada pelos ensinamentos, pela amizade e bons momentos juntos.

A funcionária do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Saionara Peixoto Rosa dos Santos, pelo auxílio na elaboração de experimentos deste trabalho.

Aos demais professores e funcionários do PPGMAA, pela atenção e colaboração, em especial aos professores do setor de Parasitologia.

A Capes, pelo apoio financeiro.

# ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Acanthamoeba* spp. EM SPAS E PISCINAS TÉRMICAS LOCALIZADOS EM PORTO ALEGRE, RS - BRASIL.<sup>1</sup>

Autor: Laura Führich Fabres

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Marilise Brittes Rott

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Lisianne Brittes Benitez

## RESUMO

Amebas de vida livre (AVL) são distribuídas mundialmente no solo e na água. Um número pequeno delas é considerado importante para a saúde dos seres humanos: *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* e *Sappinia diploidea*. Algumas das infecções são oportunistas, ocorrendo em indivíduos imunocomprometidos, enquanto outras são não oportunistas. Amostras de água foram coletadas de banheira de hidromassagens e piscinas térmicas na cidade de Porto Alegre, RS, Brasil, com o objetivo de determinar a presença de *Acanthamoeba*, bem como realizar a caracterização fenotípica e genotípica dos isolados. Amebas foram isoladas em cultivo monoxênico com *Escherichia coli*. A identificação dos isolados foi baseada na morfologia dos cistos e na amplificação por PCR com oligonucleotídeos gênero-específico. De 72 amostras analisadas, 20 (27,77%) foram positivas para amebas de vida livre, e identificadas morfologicamente como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*. Destas, 11 possuíam características compatíveis com o grupo morfológico II e 9 com o grupo III. Entre os isolados, 11(55%) foram considerados potencialmente patogênicos a partir de testes de osmotolerância e termotolerância. Somente 9 isolados quando submetidos à Reação da PCR, confirmaram pertencer ao gênero *Acanthamoeba*. A análise do sequenciamento através da comparação das sequências dispostas no GenBank, demonstrou a distribuição nos grupos genotípicos T3 (11,1%), T5 (11,1%), T4 (33,3%) e T15 (44,4%). Os resultados obtidos com este confirmam a presença de isolados potencialmente patogênicos que podem representar um risco à saúde humana nos ambientes de banheiras de hidromassagem e piscinas térmicas.

Palavras-chave: Amebas de vida livre, *Acanthamoeba*, banheira de hidromassagem, piscinas térmicas, classificação genotípica.

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil (67 p.). Agosto, 2014.

# ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *Acanthamoeba* spp. FROM THERMAL SWIMMING POOLS AND SPAS IN PORTO ALEGRE, RS - BRAZIL.<sup>1</sup>

Author: Laura Führich Fabres

Advisor: Dr<sup>a</sup> Marilise Brittes Rott

Co-advisor: Dr<sup>a</sup>. Lisianne Brittes Benitez

## ABSTRACT

Free-living amoebae (FLA) are widely distributed in soil and water. A few number of them are implicated in human disease: *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* and *Sappinia diploidea*. Some of the infections were opportunistic, occurring mainly in immunocompromised hosts, while others are non opportunistic. Water samples were collected from both hot tubs and thermal swimming pools in the city of Porto Alegre, RS, Brazil, to determine the presence of *Acanthamoeba* in the water as well as perform the phenotypic and genotypic characterization of the isolates. Amoebae were isolated in monoxenic culture with *Escherichia coli*. The identification of the isolates was based on the cysts morphology and PCR amplification using genus-specific oligonucleotides. From 72 samples analyzed, 20 (27,77%) were positive for free-living amoebae, and the isolates were morphologically identified as belonging to the genus *Acanthamoeba*. Out of these, 11 presented morphological characteristics compatible with group II, and 9 with group III. Among the isolates, 11 (55%) were considered potentially pathogenic according to osmotolerance and temperature assays. The isolates when submitted to PCR reaction only 9 were confirmed as belonging to the genus *Acanthamoeba*. The sequences analysis when compare to the sequences in the GenBank, showed that genotype distribution in group T3 (11,1%), T5 (11,1%), T4 (33,3%) and T15 (44,4%). The results of this study confirmed the presence of potentially pathogenic isolates of free living amoebae in hot swimming pool and spas which can present risks to human health.

Key-words: Free-living amoebae, *Acanthamoeba*, hot tubs, thermal swimming pool, genotypic classification.

<sup>1</sup> Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brazil (67 p.). August, 2014.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	3
1.1.1 Objetivo Geral.....	3
1.1.2 Objetivos Específicos.....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Amebas de vida livre.....	4
2.2. Classificação Taxonômica.....	6
2.3 O gênero <i>Acanthamoeba</i> .....	7
2.4 Classificações de <i>Acanthamoeba</i> .....	9
2.5 Morfologia e ciclo de vida.....	11
2.6 Ceratite por <i>Acanthamoeba</i> .....	13
2.7 Encefalite amebiana granulomatosa (EAG).....	15
2.8 Potencial patogênico de <i>Acanthamoeba</i> .....	17
2.9 Presença de AVL em spas e piscinas térmicas.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Local de Desenvolvimento do Projeto.....	21
3.2 Coletas.....	21
3.3 Avaliação da qualidade bacteriológica da água.....	22
3.3.1 Contagem de bactérias heterotróficas.....	22
3.3.2 Contagem de coliformes.....	22
3.3.1.1 Teste confirmatório para coliformes totais.....	23
3.3.1.2 Teste confirmatório para coliformes termotolerantes.....	24
3.4 Isolamento de amebas de vida livre.....	24
3.5 Obtenção de culturas monoxênicas.....	25
3.6 Obtenção de culturas axênicas.....	26
3.7 Identificação morfológica dos gêneros <i>Acanthamoeba</i> .....	26
3.8 Exflagelação dos Organismos.....	27
3.9 Estudo da patogenicidade de isolados de <i>Acanthamoeba</i> por testes de tolerância.....	27
3.9.1 Osmotolerância.....	27
3.9.2 Termotolerância.....	28
3.10 Identificação molecular dos isolados de <i>Acanthamoeba</i> .....	28
3.10.1 Extração do DNA genômico.....	28
3.10.2 Quantificação do DNA de <i>Acanthamoeba</i> .....	29
3.10.3 Confirmação dos gêneros de <i>Acanthamoeba</i> por PCR.....	30
3.10.4 Sequenciamento e análise dos fragmentos.....	31
3.10.5 Análise dos dados.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1 Isolamento de AVL em água de banheiras de hidromassagem e piscinas térmicas.....	32
4.2 Avaliação dos parâmetros físico-químicos da água.....	35
4.3 Identificação morfológica dos isolados de AVL.....	38

4.3.1 Teste de exflagelação.....	38
4.3.2 Identificação morfológica de isolados de AVL do gênero <i>Acanthamoeba</i> .....	40
4.4 Estudo de patogenicidade de isolados de <i>Acanthamoeba</i> por testes de tolerância.....	44
4.5 Identificação molecular dos isolado de <i>Acanthamoeba</i> .....	47
5. CONCLUSÕES.....	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
7. ANEXOS.....	66



## RELAÇÃO DE TABELAS

- Tabela 1.** Relação de SPAS e Clubes visitados, número de banheiras de hidromassagem e piscinas térmicas, número de amostras positivas e isolados obtidos.....34
- Tabela 2.** Variação, média e desvio padrão dos parâmetros físicos de qualidade de água na presença ou ausência de isolados de *Acanthamoeba* spp.....36
- Tabela 3.** Caracterização morfológica de isolados de AVL de água de banheiras de hidromassagem e piscinas térmicas em Porto Alegre, RS – Brasil.....40
- Tabela 4.** Diferenciação da patogenicidade de isolados de *Acanthamoeba* spp. por testes de tolerância.....45
- Tabela 5.** Análise da similaridade entre as sequências parciais do gene 18S rDNA de *Acanthamoeba* dos isolados de água de banheira de hidromassagem e piscinas térmicas deste estudo e das registradas no GenBank.....49

## RELAÇÃO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Classificação taxonômica de amebas de vida livre.....	7
<b>Figura 2.</b> Cistos de <i>Acanthamoeba</i> demonstrando as características padrões dos grupos morfológicos de Pussard e Pons (1977).....	10
<b>Figura 3.</b> Formas de vida de <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	12
<b>Figura 4.</b> Imagem mostrando úlcera em forma de anel e necrose na córnea ocular, típico de <i>Acanthamoeba</i> .....	14
<b>Figura 5.</b> Trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> em cultivo monoxênico.....	33
<b>Figura 6.</b> Cistos e trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> em placa de ágar não-nutriente com crescimento de fungo filamentoso.....	33
<b>Figura 7.</b> Cistos de <i>Acanthamoeba</i> do isolado SWP 10, grupo II.....	41
<b>Figura 8.</b> Cistos de <i>Acanthamoeba</i> do isolado SWP 07, grupo II.....	42
<b>Figura 9.</b> Cistos de <i>Acanthamoeba</i> do isolado SWP 01, grupo III.....	42
<b>Figura 10.</b> Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> do isolado P9.....	42
<b>Figura 11.</b> Produtos de amplificação da PCR do fragmento ASA.S1 do gene 18S rDNA.....	48
<b>Figura 12.</b> Dendrograma do gene 18S rDNA do gênero <i>Acanthamoeba</i> incluindo os genótipos de referência e dos isolados sequenciados.....	49

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

% - Porcento

°C – Graus Celsius

ANN – Ágar Não-Nutriente

AVL – Ameba de Vida Livre

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI - Ágar Infuso de Cérebro e Coração

BLAST – Basic Local Alignment Culture Collection

DNA – Ácido Desoxiribonucleico

dNTP – Desoxiribonucleotídeos Fostatados

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EAG – Encefalite Amebiana Granulomatosa

EMB - Ágar Eosina Azul de Metileno

M – Manitol

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio

mL – Mililitro

mM – Micro Molar

mm – Milímetro

NaCl – Cloreto de Sódio

PBS – *Phosphate buffered saline* (Tampão Fosfato Salino)

PCA - Ágar Padrão para Contagem

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pmol – Picomol

PYG – Meio Protease, peptona e extrato de levedura

rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossomal

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SNC – Sistema Nervoso Central

TAE – Tris acetato EDTA

Tris – Hidroximetil aminometano

HCl – Ácido clorídrico

µg – Microgramas

µL - Microlitros

## 1. INTRODUÇÃO

As amebas de vida livre (AVL) são protozoários amplamente distribuídos no ambiente, podendo ser encontradas em solos, rios, lagos, esgotos, piscinas, e outras fontes de água. Em geral não representam um risco à saúde humana, no entanto as AVL pertencentes aos gêneros *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Naegleria*, e *Sappinia* são organismos aeróbios de ampla distribuição geográfica e algumas espécies são patogênicas para o homem e outros animais (VISVESVARA & MAGUIRE, 2006).

Entre as AVL, *Naegleria fowleri* e *Acanthamoeba* spp. são potencialmente patogênicas para os seres humanos e animais, causando meningoencefalite amebiana primária (MAP) e encefalite amebiana granulomatosa (GAE), respectivamente. MAP é uma doença rara do sistema nervoso central que ocorre predominantemente em jovens e crianças saudáveis através da recente exposição com água tratada aquecida ou fontes naturais. Dentre as infecções causadas por *Acanthamoeba*, a ceratite amebiana é a única síndrome relacionada à água,

e tornou-se significativamente importante principalmente devido ao aumento de usuários de lentes de contato, mais predispostos ao desenvolvimento de infecções oculares. A maioria dos relatos de pessoas que contraíram esta doença possui um histórico de recreação ou mergulho em ambientes aquáticos e são usuários de lentes de contato, além da contaminação por soluções salinas de limpeza não estéreis. Os gêneros com maior número de relatos em amostras ambientais são *Acanthamoeba* e *Naegleria* (SILVA & ROSA, 2003).

As AVL são resistentes a condições extremas de temperatura e pH, e a tratamentos físico-químicos da água, incluindo o cloro, o que explica sua detecção na água de abastecimento público, piscinas e outros locais onde a água é tratada.

Vários estudos têm sido desenvolvidos em sistemas de água, rios e piscinas a fim de determinar a abundância de amebas de vida livre em ambientes aquáticos. No Brasil, alguns trabalhos de isolamento destas amebas a partir de diversas fontes ambientais já foram realizados, entretanto os dados são escassos quanto à sua caracterização. Além disso, foi relatado que as AVL isoladas de piscinas quentes foram mais patogênicas do que as isoladas de água doce naturais (DE JONCKHEERE, 1981; INIT *et al.*, 2010).

A caracterização fenotípica e genotípica dos isolados de água de banheiras de hidromassagens e piscinas de águas aquecidas, poderá prestar informações importantes sobre as formas amebianas presentes nessas águas, úteis tanto do ponto de vista acadêmico, como também para

a população em geral. O entendimento da diversidade destes organismos e o papel ocupado por estes protozoários nestes locais poderão auxiliar na aplicação de medidas de controle.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo Geral**

Isolar e caracterizar amebas de vida livre (AVL) do gênero *Acanthamoeba* presentes em água de banheiras de hidromassagem e piscinas térmicas de SPAS e Clubes localizados na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

- Realizar o isolamento de AVL em amostras de água de banheiras de hidromassagem e piscinas térmicas;
- Avaliar os parâmetros físico-químicos da qualidade da água destes locais;
- Identificar o gênero *Acanthamoeba* através de características morfológicas;
- Avaliar o potencial patogênico dos isolados de *Acanthamoeba* através de testes fisiológicos;
- Realizar a caracterização molecular de *Acanthamoeba* e *Naegleria* pela técnica de PCR, determinando seus genótipos;
- Conhecer a magnitude da distribuição ambiental destas AVL e o risco de contaminação humana.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Amebas de vida livre

Amebas de vida livre (AVL) são protozoários ubíquos e oportunistas amplamente distribuídos na natureza. Eles podem ser encontrados no solo, poeira, ar, água do mar, água potável, piscinas, esgotos, soluções de lavagem dos olhos, lentes de contato, unidades de diálise e unidades de tratamento odontológico (TRABELSI *et al.*, 2012). Entre estas AVL, apenas quatro gêneros são responsáveis por infecções oportunistas e não oportunistas em seres humanos e outros animais (VISVESVARA & MAGUIRE, 2006; TRABELSI *et al.*, 2012). AVL pertencentes aos gêneros *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* e *Sappinia pedata* foram documentadas por invadir e multiplicar-se dentro de hospedeiros mamíferos levando a infecções oportunistas e não oportunistas em humanos e animais (MARTINEZ & VIVESVARA, 1997; KHAN, 2007; GIANINAZZI *et al.*, 2010).

*Acanthamoeba* spp. tem associação com doenças humanas, tais como encefalite amebiana granulomatosa (EAG), lesões cutâneas, infecções de nasofaringes, pulmonares e renais, principalmente em paciente imunocomprometidos, podendo também causar ceratite amebiana em pessoas imunocompetentes, destacando-se entre estas doenças a ceratite amebiana e a encefalite amebiana granulomatosa (EAG). *Naegleria fowleri* causa uma patologia não oportunista chamada meningoencefalite amebiana primária (MAP) em crianças e jovens adultos saudáveis (GELMAN *et al.*, 2001; TRABELSI *et al.*, 2012). Os gêneros *Balamuthia* e *Sappinia* podem acometer tanto indivíduos imunocompetentes como imunodeprimidos e causar encefalite (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004).

O primeiro caso relatado de meningoencefalite amebiana ocorreu em 1965 na Austrália tendo como agente etiológico amebas do gênero *Naegleria* (FOWLER & CARTER, 1965). Em 1972, ocorreu o primeiro caso de infecção oportunista por *Acanthamoeba* (JAGER & STAMM, 1972). Casos de ceratite amebiana foram diagnosticados no Reino Unido e nos Estados Unidos em 1974 e 1975, respectivamente (NAGINTON *et al.*, 1974; JONES *et al.*, 1975). O primeiro caso de infecção por *Balamuthia mandrillaris* foi registrado por Visvesvara e colaboradores (1990) que a isolaram do cérebro de um babuíno que morreu por meningoencefalite em um zoológico. Posteriormente em 1993, as amebas foram detectadas em humanos (VISVESVARA *et al.*, 1993). Em 2001, *Sappinia pedata* foi relatada em um adulto imunocompetente (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004).

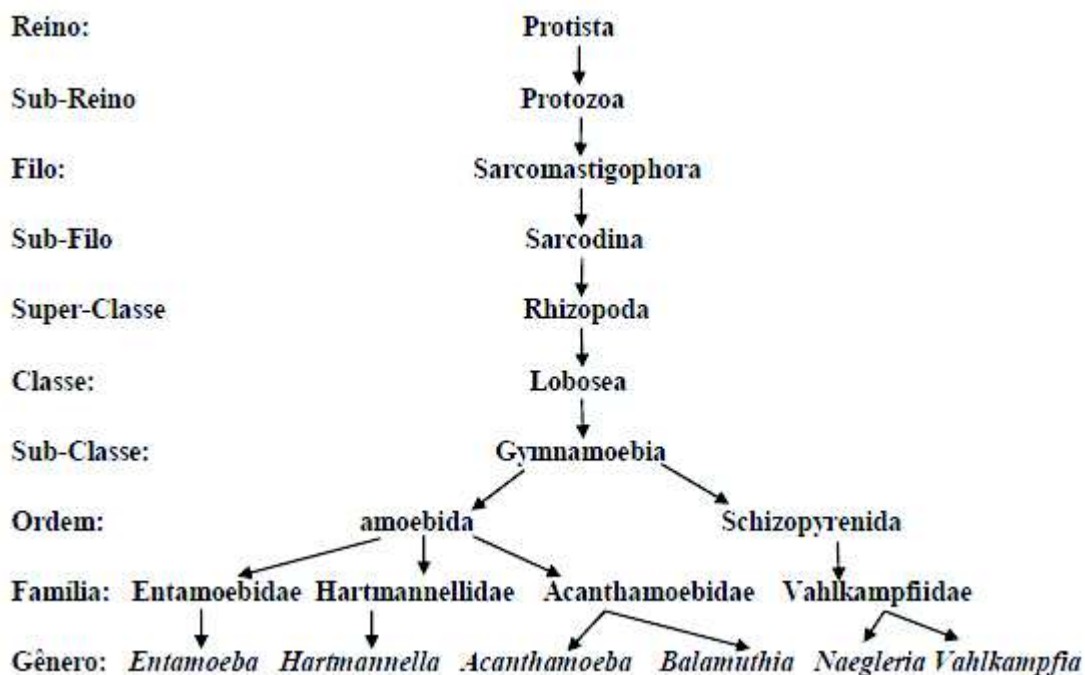


Nos últimos anos, *Acanthamoeba* spp. tem recebido grande destaque quando comparada às outras AVL devido ao aumento da incidência deste protozoários associado principalmente a casos de ceratite, bem como os inúmeros estudos de interação entre *Acanthamoeba* spp. com outros microorganismos (bactérias, fungos, leveduras, protozoários) que vem sendo publicados (SIDDIQUI & KHAN, 2012).

## 2.2. Classificação Taxonômica

As primeiras identificações eram baseadas em critérios morfológicos (SAWYER & GRIFFIN, 1975; VOLKONSKY, 1931) como divisão celular (SINGH & DAS, 1970), termotolerância (GRIFFIN, 1972), análise de isoenzimas (DE JONCKHEERE, 1987; KILVINGTON & WHITE, 1985) e patogenicidade (DE JONCKHEERE, 1981).

Atualmente a Sociedade Internacional de Protistologistas criou um sistema de classificação onde os eucariotos foram classificados em seis grupos, ou “super-grupos”, chamados de Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata e Excavata. *Acanthamoeba* e *Balamuthia* foram incluídas no grupo Amoebozoa: (subdivisão: Acanthamoebidae), juntamente com *Sappinia* (subdivisão: Thecamoebidae), enquanto que *Naegleria fowleri* no grupo Excavata (Heterolobosia: subdivisão Vahlkampfiidae) (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008a) (Figura 1).



**Figura 1:** Classificação taxonômica de amebas de vida livre. Fonte: Khan, 2006.

É importante destacar que até o momento a taxonomia das AVL não foi estabelecida de forma definitiva, estando sujeita a alterações, e esse fato se deve ao crescimento de dados provenientes do sequenciamento do DNA desses protozoários. (CORSARO & VENDITTI, 2011).

### 2.3 O gênero *Acanthamoeba*

O gênero *Acanthamoeba* foi isolado pela primeira vez a partir de poeira em 1913 por Puschkarew e chamado de *Acanthamoeba polyphagus* (PAGE, 1967). Em 1931, Volkonsky criou o gênero *Acanthamoeba*. Em 1930, Castellani isolou uma ameba que estava contaminando um placa de cultura de levedura, e foi posteriormente chamada de *Acanthamoeba castellanii*. Page (1967) reescreveu *A. polyphagus* como *Acanthamoeba polyphaga*. O gênero *Acanthamoeba* foi proposto pela primeira vez como um agente patogênico por

Culbertson e colaboradores (CULBERTSON *et al.*, 1958), durante a produção de vacinas contra o vírus da poliomielite onde foi isolada uma ameba contaminante de uma cultura de células de rim de macaco. Esta ameba, após a inoculação em camundongos e macacos, levou-os à morte por síndrome encefálica. Culbertson criou a hipótese de que *Acanthamoeba* também poderia infectar seres humanos. Esta ameba foi posteriormente designada *Acanthamoeba culbertsoni* (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008a).

*Acanthamoeba* é a ameba mais comum e mais amplamente distribuída na natureza. Ela pode sobreviver em água salobra, água doce, água do mar, areia de praia, esgotos, solo de vasos de plantas, aquários domésticos, umidificadores, aquecedores, ambientes hospitalares, unidades odontológicas, unidade de diálise, lentes de contato (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004; TRABELSI *et al.*, 2012). Ela também foi isolada de vegetais, alguns animais (peixes, répteis, anfíbios, cães, macacos, aves), secreções pulmonares, cavidade nasofaríngea e amostras de fezes (VISVESVARA *et al.*, 2007; TRABELSI *et al.*, 2012). *Acanthamoeba* pode tolerar uma ampla variação de condições tais como osmolaridade, temperatura, salinidade e pH, o que lhe permite sobreviver em água destilada, cultura de tecidos e fluidos corpóreos de mamíferos. Ela pode sobreviver a 37°C e à altas temperaturas corpóreas. Assim, algumas espécies de *Acanthamoeba* podem provocar infecções em humanos, tais como: *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba culbertsoni*, *Acanthamoeba hatchetti*, *Acanthamoeba healyi*, *Acanthamoeba astronyxix*, *Acanthamoeba divionensis* e *Acanthamoeba polyphaga* (SCHUSTER &

VISVESVARA, 2004; TRABELSI *et al.*, 2012). Outras espécies podem ser termotolerantes, mas não patogênicas.

Já foi demonstrado em estudos que mais de 80% dos indivíduos norte-americanos saudáveis possuem anticorpos contra *Acanthamoeba*, o que indica uma alta frequência de exposição dos mesmos a esta ameba (BRINDLEY *et al.*, 2009).

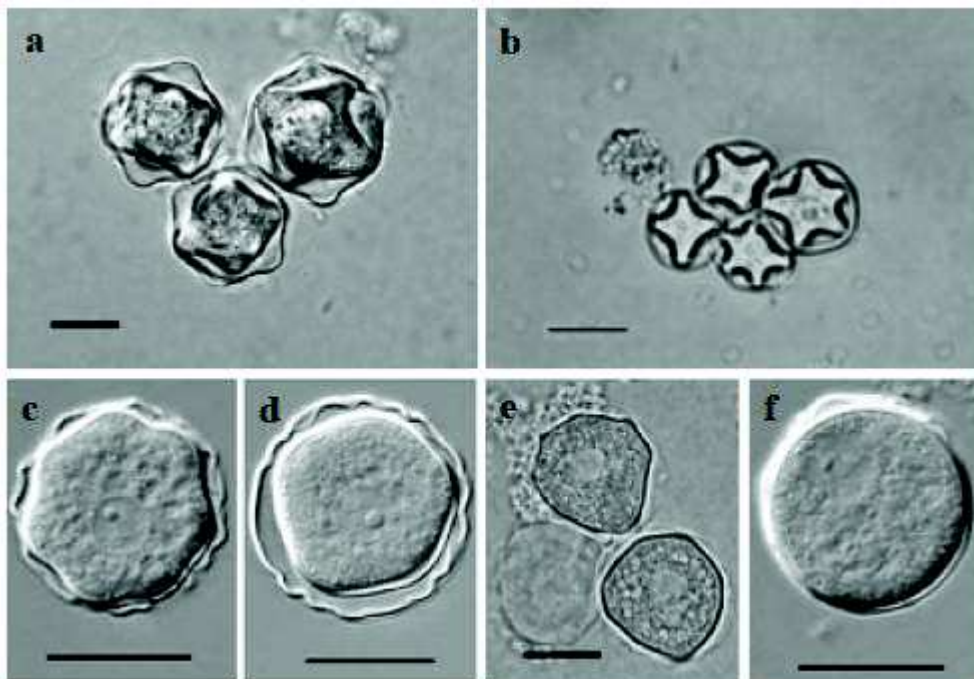
#### **2.4 Classificações de *Acanthamoeba***

As primeiras identificações de *Acanthamoeba* eram baseadas em critérios morfológicos. Foram identificadas mais de 24 espécies com base nas características morfológicas. Diversas espécies de *Acanthamoeba* estão sendo associadas a infecções em seres humanos, tais como: *A. castelanii*, *A. culbertsoni*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. healyi*, *A. lugdunensis*, *A. quina* e *A. rhyodes* (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004). As espécies de *Acanthamoeba* são divididas em três grupos com base na sua morfologia e tamanho do cisto (Figura 2):

- Grupo I: inclui quatro espécies (*A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata* e *A. tubiashi*). Estas espécies são caracterizadas por grandes trofozoítos, enquanto na forma de cisto o ectocisto e o endocisto estão afastados um do outro e apresentam as seguintes propriedades: diâmetro médio de cistos > 18  $\mu\text{m}$  – sendo o endocisto caracteristicamente estrelado e o ectocisto liso.
- Grupo II: Os ectocistos são irregulares e os endocistos podem ser poligonais, triangulares ou ovais, com um diâmetro médio < 18  $\mu\text{m}$ .

Este grupo é o mais abundante na natureza e inclui 11 espécies (*A. mauritanensis*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. divionensis*, *A. triangularis*, *A. lugdunensis*, *A. griffini*, *A. rhyodes*, *A. paradivionensis* e *A. hatchetti*);

- Grupo III: Tem cistos (<19 µm) com ectocistos lisos e endocistos em forma que varia de poligonal a oval. Este grupo inclui cinco espécies (*A. palestinensis*, *A. culbertsoni*, *A. royreba*, *A. lenticulata* e *A. pustulosa*) (PUSSARD & PONS, 1977; MARCIANO-CABRAL & CABRAL 2003).



**Figura 2:** Cistos de *Acanthamoeba* demonstrando as características padrões dos grupos morfológicos de Pussard e Pons (1977). (a)(b) cistos característicos do grupo I, apresentando ectocisto liso ou levemente ondulado e endocisto estrelado. (c)(d) cistos típicos do grupo II, apresentando ectocisto ondulado e irregular e endocisto poliédrico. (e)(f) cistos característicos do grupo III, apresentando ectocisto fino e liso ou fracamente ondulado e endocisto oval ou levemente angular. Barra: (a)(c)(d)(e)(f) 10 µm (b) 20 µm. Fonte: (a) Nuprasert *et al* (2010); (b) Costa *et al* (2010); (c)(d) Nagyová *et al* (2010); (e) Chan *et al* (2011); (f) Nagyová *et al*. (2010).

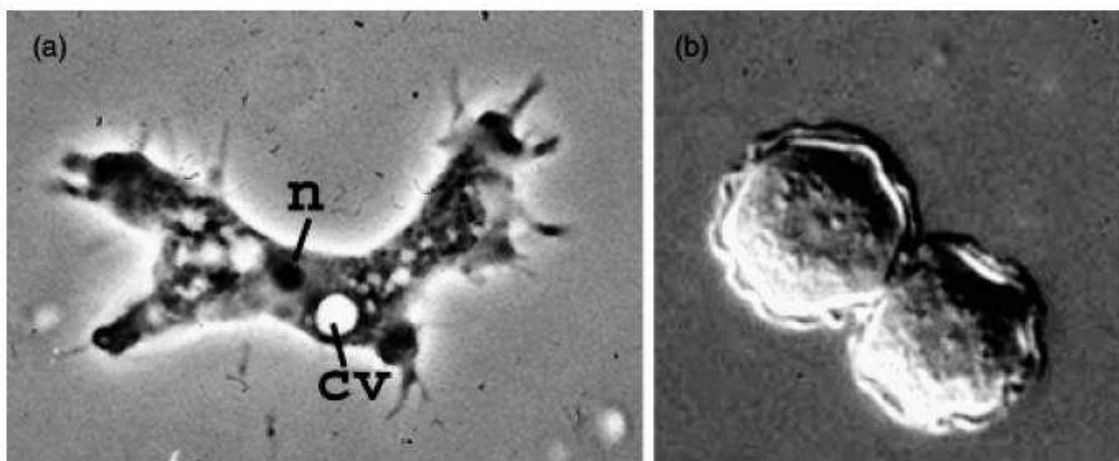
Entretanto, trabalhos mais recentes incluem novos dados provenientes de estudos de sequenciamento genômico do gene 18S rDNA. Com base na variação da sequência conservada deste gene, 19 genótipos diferentes (T1-T18) de *Acanthamoeba* foram estabelecidos: T1-T12, T13, T14, T15, T16, T17, T18 e T19 (MAGNET *et al.*, 2014). Cada genótipo apresenta 5% ou mais de sequências divergentes entre os diferentes genótipos. A maioria dos estudos mostram que 90% dos isolados de *Acanthamoeba* que produzem infecções pertencem ao genótipo T4, embora outros genótipos tenham sido relatados como agentes causadores de infecções amebianas em seres humanos e outros animais, tais como T1, T3, T5, T10, T11, T15, T17 e T18 (REYES-BATLE *et al.*, 2014). Recentemente, Magnet e colaboradores (2014) isolaram *Acanthamoeba* a partir de uma estação de tratamento de água residual e após análise filogenética, o isolado foi descrito como o novo genótipo T19.

## **2.5 Morfologia e ciclo de vida**

*Acanthamoeba* apresenta duas formas durante seu ciclo de vida: a forma vegetativa da célula, o trofozoíto (8-40  $\mu\text{m}$ ) e a forma de resistência, o cisto (8-29  $\mu\text{m}$ ) (Figura 3). A morfologia do trofozoíto é caracterizada pela presença de um único núcleo e finos acantopódios que se projetam para fora da célula a partir da sua superfície. Os acantopódios permitem adesão a superfícies, movimentos celulares e captura de presas. Trofozoítos se alimentam de bactérias, algas, leveduras, ou pequenas partículas orgânicas. A reprodução é assexuada e ocorre por fissão binária. O citoplasma é granuloso e apresenta um ou mais vacúolos contráteis evidentes (KHAN, 2006). Esta

forma invasiva e infecciosa não sobrevive por muito tempo em condições ambientais adversas (falta de alimento, extremas temperaturas e pH, aumento de osmolaridade ou baixa osmolaridade) e diferenciam-se em um cisto uninucleado com uma dupla parede (ectocisto, a parede externa e endocisto, a parede interna). De forma geral o endocisto é mais espesso e contém celulose, podendo apresentar uma variedade de formas, que variam de esférica a estrelada, enquanto que o ectocisto é fino e enrugado, sendo composto principalmente por proteínas. (VISVESVARA *et al.*, 2007). A forma resistente apresenta poros e são utilizados para monitorar as mudanças ambientais. O cisto é protegido contra a dessecação, falta de nutrientes e uma gama de agentes físicos e químicos. Foi visto que os cistos podem sobreviver *in vitro* por 20 anos ou mais. Com o retorno de boas condições de crescimento, os cistos desencistam para forma de trofozoíto (TRABELSI *et al.*, 2012).

A grande resistência dos cistos, além de conferir proteção ao protozoário, é importante também para a dispersão e persistência do gênero no ambiente (FOUQUE *et al.*, 2012).



**Figura 3:** Formas de vida de *Acanthamoeba castellanii* (a) trofozoíto e (b) cistos: n, núcleo; cv, vacúolo contrátil. Ambas imagens x1000. Fonte: Visvesvara *et al.*, (2007).

## 2.6 Ceratite por *Acanthamoeba*

O primeiro caso de infecção ocular por *Acanthamoeba* foi reportado em 1974. Desde então, muitos casos foram descritos, a maioria unilaterais. Porém casos de ceratite bilateral também foram relatados (ARANCE-GIL *et al.*, 2013).

Ceratite amebiana é uma infecção microbiana da córnea, que em sua maioria, se desenvolve em pessoas imunocompetentes. Os principais fatores de risco são usuários de lentes de contato por um período de tempo prolongado, traumatismo na córnea, lavagem de lentes de contato não estéreis, formação de biofilme nas lentes de contato e nadar em água contaminada usando lentes de contato. A transmissão de *Acanthamoeba* para córnea depende de sua virulência e do estado fisiológico da córnea. O traumatismo da córnea é considerado a porta de entrada do patógeno, como é observado que em 85% de indivíduos usuários de lentes de contato com ceratite amebiana, tiveram a abrasão da córnea anteriormente à infecção (TRABELSI *et al.*, 2012).

*Acanthamoeba* deve estar na fase de trofozoíto para se ligar às células epiteliais da córnea humana. Quando os trofozoítos se aderem ao epitélio da córnea, eles produzem uma variedade de proteases, que facilitam sua invasão na córnea, resultando em citólise mediada por parasita na córnea (ILLINGWORTH *et al.*, 1995).

A ceratite por *Acanthamoeba* é uma doença dolorosa que se caracteriza pela destruição progressiva dos tecidos da córnea. O quadro clínico



pode, nos estágios iniciais ser facilmente confundido com ceratites virais, bacterianas ou fúngicas. A característica clínica mais evidente de ceratite amebiana é a presença de um infiltrado em forma de anel, que pode conter células inflamatórias tais como neutrófilos (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003) (Figura 4).

Os principais sintomas de ceratite por *Acanthamoeba* são: sensação de corpo estranho no olho, irritação, dor severa tipicamente desproporcional ao tamanho da lesão, edema da pálpebra com pequena secreção, fotofobia e visão alterada com perda gradual da mesma (VISVESVARA & STHERGREEN, 1990; FERNANDEZ & CRESPO, 1992; OBEID *et al.*, 2003; RUTHES *et al.*, 2004).



**Figura 4:** Imagem mostrando úlcera em forma de anel e necrose na córnea ocular, típico de *Acanthamoeba*. Fonte: Demirci & Ozdamar (2013).

Com relação ao tratamento, o prognóstico para a ceratite amebiana melhorou consideravelmente nos últimos anos, provavelmente devido à melhora do diagnóstico com a microscopia confocal e o início mais precoce do tratamento. A grande problemática ainda continua sendo a resistência dos

cistos ao tratamento, o que pode levar à recorrência da infecção. Os cistos, devido a sua dupla parede e a presença de celulose na parede interna, são bastante resistentes às drogas atualmente recomendadas para o tratamento das ceratites por *Acanthamoeba*: polihex ametileno, biguanida (PHMB), clorexidina, diamidinas, isotionato de propamidina (Brolene) e hexamidina (Desomedine). O tratamento da infecção ocular é difícil e de longo prazo (MAGLIANO, 2011).

### **2.7 Encefalite amebiana granulomatosa (EAG)**

A encefalite amebiana granulomatosa (EAG) é uma infecção crônica e progressiva do Sistema Nervoso Central (SNC) causada por várias espécies de *Acanthamoeba* (VISVESVARA *et al.*, 2007). A EAG ocorre, na maioria das vezes, em humanos imunocomprometidos como portadores do vírus HIV, doentes crônicos, diabéticos, transplantados ou debilitados de outra forma sem recente contato com água doce, mostrando, que os casos podem ocorrer em qualquer época do ano (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008a).

EAG é relativamente rara, aproximadamente 200 casos foram descritos em todo mundo, sendo que em menos de dez deles o paciente sobreviveu (DIAZ, 2010). Devido à dificuldade em reconhecer EAG, é possível que outros casos tenham ocorrido, porém foram não diagnosticados ou mal diagnosticados. Na França, um único caso fatal de EAG causada por *Acanthamoeba lenticulata*, com disseminação extracerebral, em um paciente com transplante de coração foi relatado (BARETE *et al.*, 2007).

Os sintomas habituais de EAG consistem em dor de cabeça, rigidez do pescoço e anormalidades mentais, bem como náuseas, vômitos, febre baixa, letargia, ataxia cerebelar, distúrbios visuais, hemiparesia, convulsões e coma. A paralisia facial com dormência resultando em assimetria facial é facilmente vista (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008a).

As portas de entrada incluem lesões do trato respiratório inferior e da pele, seguido por disseminação hematogênica. A entrada de *Acanthamoeba* no SNC ocorre provavelmente através da barreira sangue-cérebro, em particular, através do revestimento endotelial dos capilares cerebrais (MARTINEZ, 1991). Em alguns casos, os patógenos que atingem o fluido cefalorraquidiano (LCR) entram pelo plexo coroide. Outros órgãos afetados podem incluir o tecido subcutâneo, a pele, o fígado, os pulmões, os rins, as glândulas supra-renais, o pâncreas, a próstata, os nódulos linfáticos e a medula óssea, o que sugere uma maior propagação hematogênica. As infecções cutâneas e respiratórias podem se desenvolver ao longo de vários meses mas o envolvimento do SNC pode ter consequências fatais dentro de dias ou semanas. Os mecanismos patogênicos até agora não são claros. As lesões foram mais observadas nos gânglios basais, mesencéfalo, tronco cerebral e hemisférios cerebrais com lesões características no parênquima do SNC, resultando em encefalite granulomatosa crônica. As descobertas microscópicas das biópsias *post-mortem* revelam trofozoítos e cistos, predominantemente nos espaços perivasculares do parênquima (KHAN, 2006). A fase necrótica é causada pela alimentação ativa dos trofozoítos ou processos inflamatórios, tais como a liberação de citocinas (TRABELSI *et al.*, 2012).

A maioria das espécies causadoras de EAG está agrupada no genótipo T4, mas casos já foram descritos tendo como agente etiológico *Acanthamoeba* spp. pertencentes aos genótipos T1, T2, T5, T10 e T12 (NUPRASERT *et al.*, 2010).

### **2.8 Potencial patogênico de *Acanthamoeba***

Os fatores que caracterizam cepas de *Acanthamoeba* como cepas patogênicas ou não, ainda não foram bem elucidados. A análise dos parâmetros *in vitro* e *in vivo* de isolados de *Acanthamoeba*, como resistência a temperaturas próximas do corpo humano, os efeitos citopáticos, e a sua capacidade de causar infecções em animais, têm sido propostos para identificar seu potencial patogênico. Outro critério promissor para diferenciar cepas patogênicas ou não patogênicas é a análise de suas propriedades bioquímicas e imunoquímicas (BECKER-FINCO *et al.*, 2012).

Variados são os fatores diretos e indiretos de patogenicidade do gênero *Acanthamoeba* descritos na literatura (KHAN & TAREEN, 2003). Entre os fatores diretos, estão os mecanismos dependentes do contato, tais como: adesão às células do hospedeiro e a fagocitose destas células pelos trofozoítos. O fator independente do contato é a produção de proteases extracelulares. Entre os fatores indiretos estão o crescimento em alta osmolaridade e em altas temperaturas, o crescimento em diferentes faixas de pH, a resistência a drogas, a ubiquidade e os fatores ligados ao hospedeiro.

O crescimento em altas temperaturas e alta osmolaridade são marcadores de patogenicidade de *Acanthamoeba* e alguns trabalhos têm

mostrado que isolados patogênicos exibem crescimento nestas condições (DE JONCKHEERE, 1983; WALOCHNIK *et al.*, 2000; KHAN *et al.*, 2001). Para substituir os testes que utilizam células de cultura, Khan e colaboradores (2001) sugeriram ensaios de osmotolerância, na qual somente os isolados que tivessem a capacidade de sobreviver em alta osmolaridade, seriam considerados patogênicos. Esses determinantes fisiológicos como a termo e osmotolerância podem ser usados na diferenciação e prévia caracterização de isolados clínicos e ambientais correlacionados a teste de efeito citopático (KHAN *et al.*, 2001). O mecanismo de adaptação a altas temperaturas e osmolaridade mantendo sua atividade metabólica ainda é desconhecido em *Acanthamoeba* (KHAN, 2006).

A patogenicidade é um mecanismo complexo e multifatorial que depende tanto do parasito quanto do hospedeiro não havendo um determinante principal que cause ou facilite o processo patogênico das infecções por *Acanthamoeba* em humanos (KHAN, 2006).

### **2.9 Presença de AVL em spas e piscinas térmicas**

Há na literatura diversos relatos de isolamento de amebas de vida livre de fontes aquáticas (SCAGLIA *et al.*, 1987; RIVERA *et al.*, 1989; ETTINGER *et al.*, 2003; KILVINGTON *et al.*, 2004; LORENZO-MORALES *et al.*, 2005a; GIANINAZZI *et al.*, 2009; CAUMO *et al.*, 2009; WINCK *et al.*, 2011) MAHMOUDI *et al.*, 2012). A exposição direta dos seres humanos à água de banheiras de hidromassagens e piscinas térmicas aumenta o potencial risco de infecção pelas AVL e devem ser levados em consideração. As autoridades de

saúde devem estar cientes destes potenciais riscos e fornecer medidas para garantir a segurança da população.

As fontes de água para uso recreacional, principalmente os diferentes tipos de piscinas existentes, representam um importante fator de risco para a saúde humana, uma vez que albergam várias espécies potencialmente patogênicas de *Acanthamoeba* (LORENZO-MORALES *et al.*, 2005b). A presença de isolados de *Acanthamoeba* potencialmente patogênicos em piscinas tem sido documentada em vários estudos (DE JONCKHEERE, 1979<sup>a</sup>, 1979<sup>b</sup>; RIVERA *et al.*, 1993; TSVETKOVA *et al.*, 2004; GÓRNIK & KUŽNA-GRYGIEL, 2004; GIANINAZZI *et al.*, 2009; CAUMO *et al.*, 2009; INIT *et al.*, 2010).

Scaglia e colaboradores (1983) isolaram *Naegleria australiensis* em água de piscinas térmicas de um SPA no norte da Itália. Em estudo realizado no Chile, Muñoz e colaboradores (2003) isolaram *Acanthamoeba* em somente 4,7% das amostras de piscinas públicas analisadas.

Na Polônia, Górnik e Kuzna-Grygiel (2004) obtiveram um índice de 59,7% de presença de *Acanthamoeba*. Na Suíça foram encontradas nove amostras positivas (29%) para AVL em água de piscinas térmicas (GIANINAZZI *et al.*, 2009). Na Malásia, Init e colaboradores (2010) detectaram espécies de *Acanthamoeba* e *Naegleria* em água de piscinas. Kao e colaboradores (2012a) detectaram também a presença de *Acanthamoeba* em 15% das amostras de água termais recreacionais em Taiwan. Kao e colaboradores (2013) isolaram 43,3% diferentes espécies do gênero *Naegleria* de fontes de águas termais também em Taiwan.

No Brasil, Moura (1980) a partir de piscinas de clubes da cidade do Rio de Janeiro isolou diversos gêneros de AVL, sendo que algumas amostras apresentaram moderada ação patogênica para camundongos. Salazar e colaboradores (1982) isolaram amebas do gênero *Naegleria* e *Acanthamoeba* a partir de coleções de água na cidade do Rio de Janeiro. Em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, no ano de 1984, AVL foram encontradas em água de piscinas (CHAVES, 1985). Caumo e colaboradores (2009) detectaram a presença de *Acanthamoeba* em 20% das amostras de água de piscina coletadas. Em Brasília, Alves e colaboradores (2012) também isolaram espécies de *Acanthamoeba* de piscinas, sendo quatro isolados destas piscinas apresentaram alto potencial patogênico.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local de Desenvolvimento do Projeto**

O trabalho foi desenvolvido no Setor de Parasitologia, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

#### **3.2 Coletas**

Um total de 72 amostras de água de banheiras de hidromassagem e piscinas térmicas foram coletadas durante o período de janeiro de 2013 a outubro de 2013 de quatro SPAS e sete Clubes de Porto Alegre. De cada banheira de hidromassagem ou piscina de água aquecida foram coletadas quatro amostras de água em frascos estéreis com volume de 1L. A água foi obtida na superfície em pontos diversos. No momento da coleta foram obtidos os parâmetros físicos e químicos da água, tais como temperatura e o valor do



pH. O pH foi determinado por método colorimétrico. As amostras foram acondicionadas em isopor com gelo e transportadas até o Laboratório para processamento e análise imediatamente após as coletas. As coletas das amostras foram realizadas mediante autorização da diretoria dos SPAS e Clubes através de um ofício de autorização (Anexo B).

### **3.3 Avaliação da qualidade bacteriológica da água**

#### **3.3.1 Contagem de bactérias heterotróficas**

Para a contagem de bactérias heterotróficas foi realizada a técnica de plaqueamento *pour plate*, na qual diluições sucessivas da amostra foram semeadas em Ágar Padrão para Contagem (PCA). As placas foram incubadas a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$  por 48 horas. Após incubação, foram selecionadas para contagem as placas que tinham entre 30 e 300 colônias. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias - UFC/mL, conforme protocolo do *Standard Methods* (APHA, 2005).

#### **3.3.2 Contagem de coliformes**

O Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes foi determinado pela técnica dos tubos múltiplos (APHA, 2005).

O teste presuntivo foi realizado pela inoculação da amostra em uma série de cinco tubos contendo caldo lactosado duplo e duas séries de caldo lactosado simples. Os tubos foram incubados a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$  por 24-48 horas.

Após este período, a partir dos tubos positivos, que apresentaram produção de gás (nos tubos de Durhan) e turbidez, foram feitas as análises confirmatórias para coliformes totais e termotolerantes.

### **3.3.1.1 Teste confirmatório para coliformes totais**

Dos tubos positivos em caldo lactosado foi transferido um inóculo pesado, com auxílio de alça de platina estéril, para tubos de Caldo Verde Brilhante Bile (VB). Os tubos foram incubados a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 24-48 horas. Após este período, foi observado se houve crescimento com produção de gás, representando resultado positivo para coliformes totais. A apresentação do resultado foi realizada em termos de NMP/100 mL, conforme determinado em uma tabela de cálculo estatístico do NMP apropriada ao volume de amostra inoculado.

### 3.3.1.2 Teste confirmatório para coliformes termotolerantes

Dos tubos positivos em caldo verde brilhante foi transferido um inóculo pesado, com auxílio de alça de platina estéril, para tubos de Caldo *Escherichia coli* (EC). Os tubos foram incubados em banho-maria com agitação a uma temperatura de  $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas. Após este período foi observado se houve crescimento com produção de gás, representando resultado positivo para coliformes termotolerantes. Novamente os resultados foram expressos em termos de NMP/100 mL, baseados em uma tabela de NMP apropriada ao volume de amostra inoculado.

Os resultados positivos em caldo EC foram repicados para placas de Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), para isolamento de *Escherichia coli*. As colônias que apresentaram as características para este microrganismo foram transferidas para tubos com Ágar Infuso de Cérebro e Coração (BHI) inclinado e estes foram incubados a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. A partir das culturas puras em BHI, foi feita a coloração de Gram e as provas bioquímicas de identificação: indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato (IMViC).

### 3.4 Isolamento de amebas de vida livre

As amostras de 1L de água, foram filtradas utilizando membrana de nitrocelulose de 47mm de diâmetro e porosidade de 3  $\mu\text{m}$ . Em seguida a membrana foi retirada com o auxílio de uma pinça estéril, colocada em uma placa de Petri e lavada com 2 ml de solução PBS com Tween 80 (0,2%), removendo o material com o auxílio de um raspador (“cell scraper”), que

desprende os microrganismos da membrana. O eluato foi então transferido para microtubos e centrifugado a 2.500 r.p.m durante 15 min. O sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspendido com 0,5 mL de solução salina de Page (NaCl, MgSO<sub>4</sub> .7 H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> . 2H<sub>2</sub>O), (RIVERA *et al.*, 1993; DE CARLI, 2001) e transferido para placas de ágar não-nutriente (ANN) 1,5 % (Anexo A) cobertas com uma suspensão de *Escherichia coli* (ATCC 25922) inativadas pelo calor a 56 °C/2h. As placas foram seladas com filme plástico (Parafilm®) e incubadas a 30°C por até 15 dias. O exame das placas foi realizado diariamente em microscópio óptico para observar a presença de amebas de vida livre (trofozoítos e/ou cistos). Para cada amostra de água, três placas foram preparadas. As placas negativas para AVL foram descartadas após o período máximo de 30 dias de observação.

### **3.5 Obtenção de culturas monoxênicas**

As amostras que apresentaram amebas de vida livre foram subcultivadas até obtenção de cultura monoxênica, com a finalidade de manter os isolados, e eliminar possíveis contaminantes ambientais, tais como fungos filamentosos, leveduras e bactérias. As áreas das placas com AVL foram marcadas com um círculo, posteriormente as placas foram abertas sob condições de esterilidade e com auxílio de uma lâmina estéril, um pedaço de ágar da área marcada foi cortado. O pedaço de ágar foi então removido com a face voltada para baixo e transferido para uma nova placa de ANN coberta com *Escherichia coli* (ATCC 25922). As placas foram seladas e incubadas a 30°C por 15 dias.

### 3.6 Obtenção de culturas axênicas

Para o cultivo de *Acanthamoeba* spp. em meio líquido sem a presença de bactérias e outros contaminantes, os isolados obtidos em culturas monoxênicas de no máximo 72h de crescimento, foram transferidos para tubos contendo 5 mL de PYG (proteose peptona, extrato de levedura e glicose) suplementado com antibióticos (400 UI/ mL de Penicilina G Potássica e 400 µg/mL de Estreptomicina) e incubados a 30°C. Subcultivos para novos tubos contendo PYG e antibióticos foram realizados em intervalos variáveis de no máximo sete dias com a finalidade de eliminar a associação com bactérias dentro de duas a três semanas.

### 3.7 Identificação morfológica dos gêneros *Acanthamoeba*

Estudo morfológico para a identificação das AVL dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria* foi realizado pela observação de cistos e trofozoítos. Os critérios morfológicos avaliados estavam de acordo com o proposto por Page (1988) e se baseiam nos seguintes parâmetros: movimento dos trofozoítos, dimensões, presença de acantopódios ou flagelos. A morfologia dos cistos de *Acanthamoeba* foi analisada de acordo com Pussard & Pons (1977). Essas características foram observadas em microscópio óptico, microscópio invertido e microscópio de contraste de fase. Foram medidos 10 cistos de cada isolado para obtenção de uma média aritmética e cálculo de desvio padrão.

### **3.8 Exflagelação dos Organismos**

Este experimento possui a finalidade de identificar *Naegleria fowleri*. Após o isolamento de AVL e obtenção de culturas monoxênicas com formas trofozoíticas, adicionou-se 10 mL de água destilada estéril sobre a superfície do ágar não-nutriente para obtenção de uma suspensão de AVL. Após, esta suspensão foi transferida para garrafas de cultivo celular e incubadas a 37 °C. As garrafas foram examinadas a cada 30 minutos durante 4 horas em microscópio invertido para verificar a emissão de flagelos (DE CARLI, 2001; SILVA & ROSA, 2003).

### **3.9 Estudo da patogenicidade de isolados de *Acanthamoeba* por testes de tolerância**

Os isolados de *Acanthamoeba* spp. obtidos das amostras foram submetidos a testes de osmotolerância e termotolerância. Estes testes são utilizados como marcadores na diferenciação de isolados patogênicos e não-patogênicos, como descrito por Khan e colaboradores (2001).

#### **3.9.1 Osmotolerância**

Placas com Ágar Page padrão (controle), e placas com Ágar Page acrescido de 0,5 molar e 1,0 molar de manitol foram utilizados para o ensaio de osmotolerância. Um volume de 5 µL, de uma diluição de 200 mil trofozoítos por

mililitro foi inoculado no centro de cada uma das placas. As placas foram incubadas em estufa a 30°C, por dez dias. Após este período, as placas foram examinadas, contando-se cinco campos em um raio de 20 centímetros do local da inoculação. Foram contados os números de cistos e trofozoítos presentes em cada uma das placas.

### **3.9.2 Termotolerância**

No ensaio de termotolerância foram utilizadas três placas de Ágar Page para cada isolado. Um volume de 5 µL, de uma diluição de 200 mil trofozoítos por mililitro foi inoculado no centro de cada uma das placas e as mesmas foram incubadas em temperaturas distintas: 30°C (controle); 37°C e 42°C, por dez dias. Após este período, as placas foram examinadas, contando-se cinco campos em um raio de 20 centímetros do local da inoculação. Foram contados os números de cistos e trofozoítos presentes em cada uma das placas.

## **3.10 Identificação molecular dos isolados de *Acanthamoeba***

### **3.10.1 Extração do DNA genômico**

Para a extração de DNA total dos isolados de *Acanthamoeba* foi empregado protocolo descrito por Salah & Iciar (1997) com algumas modificações. Uma quantidade inicial de  $10^3$  a  $10^5$  trofozoítos/mL dos isolados de cada gênero obtida de culturas axênicas em meio PYG foi centrifugada a

250 x *g* durante 10 min. O sedimento foi submetido a três lavagens com 1 mL de PBS estéril e centrifugado por 3 min a 250 x *g*, para eliminar os restos de meio de cultivo. Posteriormente foi adicionado ao sedimento um volume de 400 µL de tampão de extração (0,4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 2 mM EDTA pH 8,0) e agitadas em vórtex por 10 a 15 s. Após foi adicionado 40 µL de sódio dodecil sulfato 20 % (SDS) e 8 µL de Proteinase K 20 mg/mL (concentração final 400 µg/mL) (Invitrogen). As amostras foram incubadas em banho de água a 55 °C durante 1 hora e após foram adicionados 300 µL de NaCl 6 M em cada mistura. As amostras foram novamente agitadas em vórtex por 30 s e centrifugadas por 10 min a 10.000 x *g*. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionado 700 µL de álcool isopropílico, incubado a -20 °C por 1 hora e posteriormente os tubos foram centrifugados por 20 min a 10.000 x *g*. O DNA foi lavado com etanol 70 % e centrifugado por 10 min a 10.000 x *g*. Depois de seco à temperatura ambiente, o DNA foi ressuspenso em 100 µL de água ultra-pura esterilizada e quantificado em gel de agarose.

### **3.10.2 Quantificação do DNA de *Acanthamoeba***

A quantificação do DNA dos isolados de *Acanthamoeba* foi realizada através do Espectrofotômetro (Nanovue, GE Healthcare Life Sciences, versão 4.0).



### 3.10.3 Confirmação dos gêneros de *Acanthamoeba* por PCR

A confirmação do gênero *Acanthamoeba* dos isolados incluídos no estudo foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados amplificam uma região de aproximadamente 450 pares de base denominado ASA.S1 do rDNA 18S, que é altamente específico para o gênero *Acanthamoeba*. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação foram:

JDP1 (senso): 5' - GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA -3'

JDP2 (anti-senso): 5' - TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA -3'

A reação de PCR, com base no protocolo de Booton *et al.* (2004) foi realizada em volume final de 50  $\mu$ L, contendo 20-30 ng de DNA, 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen®), 0,4  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo iniciador, tampão de reação (50 mM KCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 U de Taq polimerase (Invitrogen®).

A PCR foi realizada em um termociclador "PTC 150 MiniCycler Hot Bonnet - MJ Research" programado para uma desnaturação inicial de 94 °C por 5 min, seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 94 °C por 1 min e 72 °C por 1 min e uma extensão final de 72 °C por 5 min.

O controle negativo incluiu todos os reagentes exceto DNA. O isolado de *Escherichia coli* (ATCC 25922) também foi usado como controle negativo. Os isolados de referência *A. castellanii* Neff (ATCC 30010) e *A. castellanii* T4 (ATCC 50492) foram usados como controles positivos. Após, o produto da PCR foi analisado em eletroforese em gel de agarose a 1%, corado

com brometo de etídeo (0,5  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) e visualizado em luz ultravioleta com um transluminador.

#### **3.10.4 Sequenciamento e análise dos fragmentos**

Os produtos da PCR foram purificados através do kit de purificação QIAquick (QUIAGEN GmbH, Hilden, Germany), seguindo as instruções do fabricante. Os nove isolados de água de piscinas térmicas que foram positivos para o gênero *Acanthamoeba*, foram sequenciados utilizando o sequenciador automático MegaBace 1000. As nove sequências do gene 18S rDNA foram buscadas no banco de dados GenBank e comparadas com sequências nucleotídicas de espécies de *Acanthamoeba* já depositados no banco, utilizando o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para classificar os isolados obtidos (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

#### **3.10.5 Análise dos dados**

Dados descritivos foram analisados através de cálculo percentual, média e desvio padrão. O teste T student a 5% de probabilidade foi utilizado para verificar a influência dos parâmetros físico-químicos da qualidade da água em relação à presença de AVL.

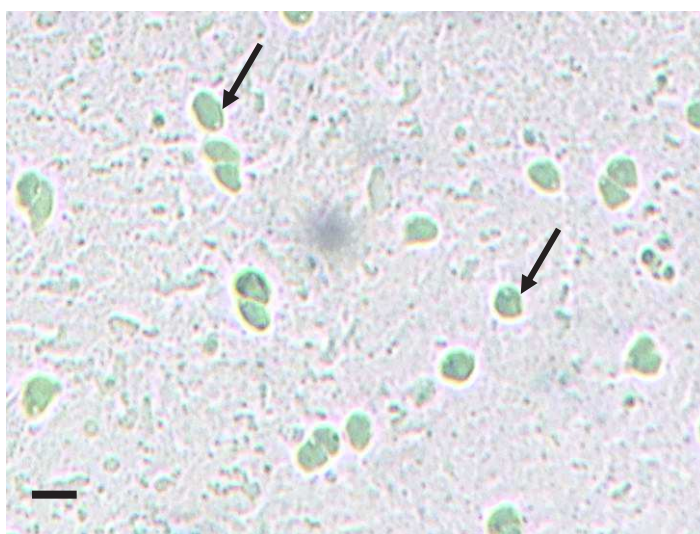
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento de AVL em água de banheiras de hidromassagem e piscinas térmicas

Dos 11 SPAS e clubes recreativos da cidade de Porto Alegre-RS submetidos à análise da água de suas banheiras de hidromassagem e piscinas térmicas, 6 (33,33%) indicaram a presença de AVL. Das 72 amostras analisadas, 20 (27,77%) foram positivas para AVL (Tabela 1).

Os cistos e trofozoítos foram observados a partir de uma semana após o cultivo das amostras de água em placas de ágar não-nutriente 1,5% cobertas com *E. coli* (Figura 5). Os trofozoítos apresentavam nucléolo bem definido, acantopódios e vacúolos pulsáteis visíveis. Outros organismos como bactérias, fungos e ácaros também estavam presentes nas amostras na etapa inicial do isolamento (Figura 6). Subcultivos foram realizados para obtenção de culturas monoxênicas a partir da técnica de seleção de áreas das placas sem contaminantes para novas placas de cultivo. Frequentemente as placas eram contaminadas por fungos filamentosos, dificultando a monoxenização das

amostras, tornando assim o isolamento mais trabalhoso. Schuster (2002) observou que a maior dificuldade no isolamento de AVL é estimular o crescimento das amebas, concomitantemente inibindo o crescimento de outros organismos contaminantes. Tsvetkova e colaboradores (2004) relataram esta mesma dificuldade em amostras ambientais.



**Figura 5** – Trofozoítos de *Acanthamoeba* em cultivo monoxênico. Microscópio óptico (100X). Medida da barra 30 $\mu$ m.



**Figura 6** – Cistos <sup>a</sup> e trofozoíto <sup>b</sup> de *Acanthamoeba* em placa de ágar não-nutrientes com crescimento de fungo filamentosos <sup>c</sup>. Microscópio óptico (100X). Medida da barra 60  $\mu$ m.

Tabela 1 – Relação de SPAS e Clubes visitados, número de banheiras de hidromassagem e piscinas térmicas, número de amostras positivas e isolados obtidos: H – banheira de hidromassagem; PT – piscina térmica.

Spas e Clubes	Nº de fontes de água	Tipo de fontes de água	Amostras	Isolados
1	1	1H	-	
2	2	1H/1PT	4+ (1H, 3PT)	WHT 01, WSP 01, WSP 02, WSP 03
3	1	1H	-	
4	3	1H/2PT	5+(5PT)	WSP 04, WSP 05, WSP 06, WSP 07, WSP 08
5	2	1H/1PT	1+(PT)	WSP 09
6	1	1PT	-	
7	2	2PT	1+(PT)	WSP 10
8	1	1PT	4+(PT)	WSP 11, WSP 12, WSP 13, WSP 14
9	2	2 PT	5+ (PT)	WSP 15, WSP 16, WSP 17, WSP 18, WSP 19
10	2	1H1/PT	-	
11	1	1PT	-	
<b>TOTAL</b>	<b>72 amostras</b>	<b>24 H / 48 PT</b>	<b>20 amostras positivas</b>	<b>20 isolados 1H/19PT</b>

A presença de *Acanthamoeba* spp. com potencial patogênico em piscinas tem sido documentada em diversos estudos (DE JONCKHEERE, 1980; 1993; KUHLENCORD *et al.*, 1989;. RIVERA *et al.*, 1993; GORNIK & KUZNA-GRYGIEL, 2004; GIANINAZZI *et al.*, 2009; CAUMO *et al.*, 2009; CAUMO & ROTT, 2010). Entre as AVL, *Acanthamoeba* spp. é a mais comum e provavelmente mais encontrada em amostras de água (PAGE, 1988). Além disso, é evidenciada sua alta prevalência em amostras relacionadas com habitats aquáticos frequentados por seres humanos (LORENZO-MORALES *et al.*, 2005a). Na Itália, Scaglia e colaboradores (1983) coletaram amostras de água de piscinas terapêuticas de SPAS e isolaram cepas de *Naegleria australiensis*. Na Suíça, Gianinazzi e colaboradores (2010) coletaram água de

piscinas e hidromassagens de quatro resorts, e encontraram nove amostras positivas para AVL no total de 31 amostras coletadas.

No Brasil, existem alguns estudos sobre a presença de AVL em água de piscinas, como o realizado por Alves e colaboradores (2006) no Distrito Federal, onde isolaram AVL dos gêneros *Naegleria*, *Acanthamoeba* e *Vannela*. Em Porto Alegre, Caumo e colaboradores (2009), coletaram água de piscinas térmicas e não térmicas de clubes recreativos, e isolaram AVL do gênero *Acanthamoeba*. Até o presente momento não se tem conhecimento de estudos realizados no Brasil quanto a presença de AVL em banheiras de hidromassagem e piscinas de SPAS, sendo esta a primeira investigação a ser realizada nestes locais.

#### **4.2 Avaliação dos parâmetros físico-químicos da água**

Os parâmetros físico-químicos da água de banheiras de hidromassagem e piscinas térmicas, tais como, pH, temperatura, cloro livre, presença de coliformes totais e coliformes termotolerantes e presença de bactérias heterotróficas, foram avaliados, com o objetivo de observar a influência destes fatores na presença de AVL. Todas as banheiras de hidromassagem e piscinas térmicas avaliadas eram cloradas e seguiam as especificações da legislação vigente da cidade de Porto Alegre, Resolução N° 5/96 atualizada pela norma técnica N°01/96. As médias dos valores dos parâmetros físico-químicos da água das banheiras de hidromassagem e piscinas térmicas está apresentada na tabela 2.

Tabela 2 – Variação, média e desvio padrão (DP) dos parâmetros físicos de qualidade de água na presença ou ausência de isolados de *Acanthamoeba* spp.

Parâmetros de qualidade de água	Amostras positivas para <i>Acanthamoeba</i>		Amostras negativas para <i>Acanthamoeba</i>	
	Variação	Média ± DP	Variação	Média ± DP
Cloro residual livre (mg/L)	1 - 4	2,7 ± 1,0	1 - 4,5	2,7 ± 1,2
pH	6 - 7	6,5 ± 0,5	5 - 7	5,8 ± 0,6
Temperatura (°C)	30 - 34	32,2 ± 1,3	21 - 42	31,9 ± 5,9

A partir da análise feita através do teste T ( $P < 0.05$ ), houve diferença significativa entre amostras positivas e amostras negativas para *Acanthamoeba* apenas para o valor do pH, não foram observadas diferenças significativas nos outros parâmetros físico-químicos da água. As amostras positivas apresentaram um valor médio de pH superior ao das amostras negativas.

Todas as amostras foram negativas para o teste confirmatório de coliformes totais ( $<1,8$  NMP/10mL). Para a contagem de bactérias heterotróficas, foi realizado um experimento prévio ao qual foi inoculado 100 $\mu$ L diretamente da amostra na placa com Ágar Padrão para Contagem, 70% das amostras não apresentaram crescimento de UFC/mL, ou tiveram um crescimento inferior a 30 colônias. Não houve diferença significativa entre a presença e ausência de *Acanthamoeba* spp. e a presença de bactérias heterotróficas. Com os resultados obtidos, presume-se que não houve relação

entre a presença de bactérias heterotróficas e *Acanthamoeba*. A ausência de coliformes totais é provavelmente devido à utilização do cloro como método de desinfecção da água das banheiras de hidromassagem e piscinas térmicas.

Nos estudos de Silva & Rosa (2003) foi observado que isolados de *Acanthamoeba* são resistentes a variações de temperatura e pH. Caumo e colaboradores (2009) avaliaram parâmetros de qualidade de água tais como, temperatura, pH e cloro residual livre e não observaram diferenças significativas entre amostras positivas e negativas para *Acanthamoeba*. Em Taiwan, Hsu e colaboradores (2009) analisaram os parâmetros físico-químicos da água tais como, temperatura, pH, turbidez, contagem de bactérias heterotróficas e coliformes totais, em amostras positivas e negativas para AVL, onde não observaram diferenças significativas entre a presença/ausência de AVL e os parâmetros físicos, no entanto, diferenças significativas foram observadas entre a presença/ausência de *Hartmannella* e coliformes totais, e a presença/ausência de *Naegleria* e bactéria heterotróficas. Kao e colaboradores (2012a) analisaram os seguintes parâmetros físico-químicos da água: temperatura, pH, turbidez, contagem de bactérias heterotróficas e coliformes totais para presença/ausência de *Acanthamoeba* e foi observado diferença significativa apenas no valor de pH, sendo que as amostras positivas apresentaram valores médios maiores de pH em comparação com as amostras negativas. Estes resultados corroboram com os do presente estudo. *Acanthamoeba* spp. sobrevive facilmente em condições moderadamente alcalinas (Kao *et al.*, 2012a). O pH das piscinas e banheiras de hidromassagem pela norma vigente de Porto Alegre, deve variar entre 7,2 e 7,8,



proporcionando um pH levemente alcalino, o que poderia facilitar o crescimento e reprodução de AVL como *Acanthamoeba*.

Rivera e colaboradores (1993), observaram que a concentração de cloro comumente usada em piscinas (0,5 a 1,5 mg/mL) não era suficiente para eliminar cistos de AVL. A concentração aceitável de cloro livre nas piscinas e banheiras de hidromassagem em Porto Alegre, pela norma vigente é de 1 a 1,5ml/L. No presente estudo, foi observado que estas concentrações de cloro recomendadas para o tratamento das águas não são suficientes para eliminar cistos viáveis de *Acanthamoeba*.

### **4.3 Identificação morfológica dos isolados de AVL**

#### **4.3.1 Teste de exflagelação**

O teste de exflagelação foi negativo para os 20 isolados de AVL obtidos das amostras de água de banheira de hidromassagem e piscinas térmicas, indicando não haver nenhum isolado de *Naegleria fowleri*. O gênero *Naegleria* apresenta três fases no seu ciclo de vida: trofozoíto (10-25µm), cisto (8-20µm) e uma forma transitória flagelada (10-16µm) a qual apresenta dois flagelos anteriores. O trofozoíto se modifica na forma flagelada, quando colocado em água destilada, ou quando há perda de nutrientes no ambiente, podendo retornar a forma trofozoítica quando as condições se tornam favoráveis. Esta fase permite a sua dispersão no solo ou na água (TRABELSI *et al.*, 2012). Em laboratório, trofozoítos, quando suspensos em água destilada, podem ser induzidos à forma flagelada dentro de uma hora (VISVESVARA &

SCHUSTER, 2008a). O gênero *Naegleria* apresenta uma fragilidade maior ao uso de desinfetantes, sendo seus cistos mais vulneráveis comparados aos cistos de *Acanthamoeba* (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008b).

Em um estudo realizado na Itália, Scaglia e colaboradores (1983), isolaram *Naegleria australiensis* de piscinas com temperatura entre 25°C e 32°C, porém a concentração de cloro livre nestas piscinas era entre 0,22 e 0,60 mg/ml, abaixo do nível apresentado nas piscinas no presente estudo. No México, Rivera e colaboradores (1993) isolaram amebas de vida livre de piscinas, entre elas, o gênero *Naegleria*, contudo apenas em piscinas com baixa concentração de cloro livre, entre 0,0 e 1,19 mg/ml. No estudo realizado na Polônia por Górnik & Kuźna-Grygiel (2004), em 72 amostras de água de piscinas analisadas, nenhum isolado de *Naegleria* foi identificado por análise das características morfológicas e teste de exflagelação. Na Malásia, Init e colaboradores (2010) isolaram espécies de *Acanthamoeba* e *Naegleria* de água de piscinas, o número de isolados de *Acanthamoeba* foi superior ao de *Naegleria*, sugerindo que os cistos de *Acanthamoeba* são mais resistentes, mantendo-se viáveis por mais tempo em água clorada do que os cistos de *Naegleria*, que são mais frágeis. Um estudo realizado por Alves (2006) em Brasília (BR), foram realizadas coletas de água de piscinas e os autores encontraram amostras positivas para AVL, principalmente do gênero *Naegleria*. Este resultado pode ter acontecido pelo fato das coletas terem sido realizadas na época de chuvas da região. Em Porto Alegre, Caumo e colaboradores (2009) realizaram 65 coletas de água de piscinas térmicas e não térmicas, e encontraram 13 isolados de *Acanthamoeba*, todavia não foi encontrado

nenhum isolado do gênero *Naegleria*. Estes resultados estão em concordância com os encontrados do presente estudo.

#### 4.3.2 Identificação morfológica de isolados de AVL do gênero *Acanthamoeba*

Todos os isolados de AVL obtidos a partir das amostras de água de banheiras de hidromassagem e piscinas térmicas foram sugestivos de pertencer ao gênero *Acanthamoeba* de acordo com as características morfológicas (Tabela 3) (Figuras 7, 8, 9 e 10). Os trofozoítos foram reconhecidos pela sua locomoção lenta, citoplasma com zona periférica hialina, nucléolo bem definido, vacúolos pulsáteis e a presença de projeções aciculiformes, os chamados acantopódios. As medidas dos cistos foram compatíveis com o gênero, conforme descrito por Marciano-Cabral & Cabral (2003).

Tabela 3 – Caracterização morfológica de isolados de AVL de água de banheira de hidromassagem e piscinas térmicas em Porto Alegre, RS – Brasil. AH – água de banheira de hidromassagem; AP – água de piscina térmica; DP – Desvio padrão;

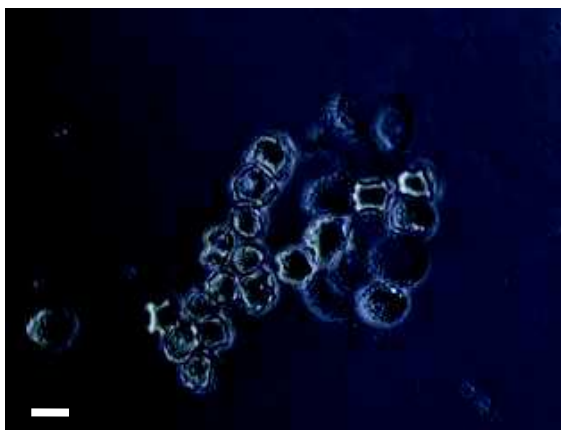
Isolados	ATCC	Fontes	Média Diâmetro dos Cistos ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ DP	Grupo Morfológico (Pussard & Pons, 1977)
<i>A. Castelanii</i> Neff	30010	Solo	14,8 $\pm$ 1,0	II
<i>A. Castelanni</i> T4	50492	Ceratite	12,4 $\pm$ 0,8	II
WHT 01		AH	12,2 $\pm$ 2,9	II
WSP 01		AP	11,4 $\pm$ 1,6	III
WSP 02		AP	11,2 $\pm$ 1,5	III
WSP 03		AP	10,3 $\pm$ 1,3	III
WSP 04		AP	9,5 $\pm$ 1,0	II
WSP 05		AP	9,5 $\pm$ 1,3	II
WSP 06		AP	10,3 $\pm$ 2,2	II
WSP 07		AP	12,2 $\pm$ 2,8	II
WSP 08		AP	8,6 $\pm$ 2,0	III
WSP 09		AP	10,7 $\pm$ 0,9	III

WSP 10	AP	11,4 ± 2,2	II
WSP 11	AP	13,5 ± 3,4	II
WSP 12	AP	12,0 ± 2,8	II
WSP 13	AP	10,7 ± 1,27	III
WSP 14	AP	10,9 ± 1,27	II
WSP 15	AP	9,9 ± 0,9	III
WSP 16	AP	12,2 ± 2,2	III
WSP 17	AP	10,1 ± 0,9	III
WSP 18	AP	10,5 ± 1,3	II
WSP 19	AP	11,4 ± 1,0	II

A identificação dos cistos foi realizada através da classificação de Pussard & Pons (1997), que divide o gênero *Acanthamoeba* em três grupos de acordo com tamanho e aspectos morfológicos gerais dos cistos. Os cistos foram caracterizados pela forma do endocisto e ectocisto. Onze isolados foram classificados como pertencentes no grupo morfológico II e nove isolados foram classificados no grupo morfológico III. Nenhum isolado apresentou características do grupo I.



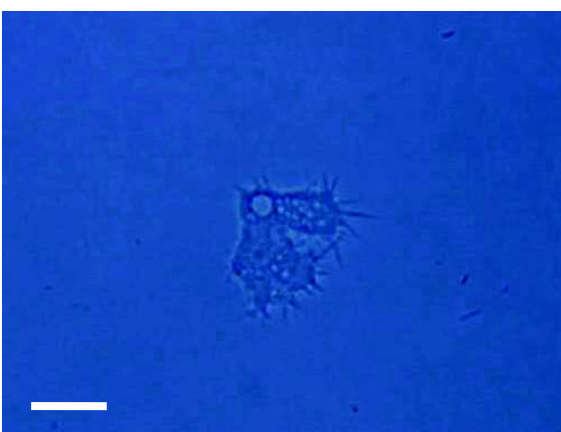
**Figura 7** - Cistos de *Acanthamoeba* do isolado WSP 10, grupo II. Microscópio de contraste de fase (1000X); Barra = 11  $\mu$ m.



**Figura 8** - Cistos de *Acanthamoeba* do isolado WSP 07, grupo II. Microscópio de contraste de fase (1000X); Barra = 12  $\mu$ m.



**Figura 9** - Cistos de *Acanthamoeba* do isolado WSP 01, grupo III. Microscópio de contraste de fase (1000X); Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 10** – Trofozoíto de *Acanthamoeba* do isolado WSP 09. Microscópio de contraste de fase (1000X); Barra = 9  $\mu$ m.

Alves (2006) encontrou oito amostras de solo e água positivas para *Acanthamoeba* com morfologia similar aos grupos morfológicos II e III. No estudo de Caumo e colaboradores (2009), foram encontrados 13 isolados de *Acanthamoeba* de água de piscinas térmicas e não térmicas, entre estes, nove foram classificados no grupo morfológico II e quatro no grupo morfológico III. Winck e colaboradores (2011) obtiveram 10 isolados de *Acanthamoeba* de amostras de água de torneira, entre eles, nove foram classificados no grupo morfológico II e apenas um isolado no grupo morfológico III. No estudo de Possamai (2012) foram realizadas coletas de amostras clínicas e ambientais, somando 28 isolados de *Acanthamoeba* (24 ambientais, três clínicos e um de lentes de contato), entre eles 26 apresentaram características morfológicas do grupo II, um do grupo I e um não foi classificado. Duarte e colaboradores (2013) encontraram sete isolados de *Acanthamoeba* de amostras clínicas e de poeira, onde todos os cistos foram classificados no grupo morfológico II.

No grupo II estão classificados as espécies mais comumente isoladas de amostras ambientais e de amostras clínicas (PAGE, 1967; WALOHNICK *et al.*, 2000; BOOTON *et al.*, 2005; CAUMO *et al.*, 2009). Neste grupo estão as espécies de *Acanthamoeba* responsáveis pela maioria dos casos de meningoencefalites e ceratites (STOTHART *et al.*, 1998). Dessa forma, este trabalho confirma os dados da literatura, uma vez que a maioria dos isolados obtidos apresentou características morfológicas compatíveis com o grupo II.

A identificação molecular dos isolados é importante, pois a caracterização através da morfologia não é precisa e ocorre dentro de um

mesmo clone variações na forma dos cistos (PAGE, 1988; VISVESVARA, 1991; MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; SILVA & ROSA, 2003). Além disso, esta classificação foi considerada pouco confiável visto que existe variação na morfologia dos cistos causada por diferentes condições do meio de cultura (TRABELSI *et al.*, 2012).

#### **4.4 Estudo de patogenicidade de isolados de *Acanthamoeba* por testes de tolerância**

O potencial patogênico dos isolados deste estudo foi determinado pelos testes de termotolerância e osmotolerância, conforme Khan e colaboradores (2001). Os isolados foram submetidos a duas diferentes temperaturas e duas diferentes concentrações de manitol. Todos os isolados observados neste estudo apresentaram crescimento a 37°C, bem como a 0,5 M de manitol (Tabela 4). Dez isolados (WHT1, WSP 03, WSP 04, WSP 05, WSP 09, WSP 10, WSP 12, WSP 13, WSP 14 E WSP 19) apresentaram crescimento a 42°C, e apenas dois (WSP 05 e WSP 07) cresceram à concentração de 1,0 M de manitol. Apenas um isolado (WSP 05) cresceu à concentração de 1 M de manitol e também à temperatura de 42°C, sendo considerado potencialmente patogênico. Os isolados que cresceram a 42°C e não cresceram a 1 M de manitol, bem como os isolados que cresceram a 1 M de manitol e não cresceram a 42°C foram considerados com potencial patogênico baixo. E os isolados que não cresceram a 42°C e 1 M de manitol foram considerados não-patogênicos (WSP 01, WSP 02, WSP 06, WSP 08, WSP 11, WSP 15, WSP 16, WSP 17 e WSP 18).

Tabela 4 – Diferenciação da patogenicidade de isolados de *Acanthamoeba* spp. por testes de tolerância: (-) ausência de *Acanthamoeba*, (+) 1 a 15 trofozoítos, (++) 16 a 30 trofozoítos, e (+++) >30 trofozoítos. Avaliação feita em cinco campos microscópicos (1000X). \*Critérios estabelecidos por Khan *et al.*, 2001.

Isolados	ATCC	Temperatura de crescimento		Crescimento em Manitol		Patogenicidade*
		37°C	42°C	0,5 M	1 M	
<i>A.Castelanii</i> Neff	30010	+++	-	++	-	Não-patogênico
<i>A.Castelanni</i> T4	50492	+++	++	+++	++	Potencialmente patogênico
WHT 01		+++	+	+++	-	Baixo potencial patogênico
WSP 01		+++	-	+	-	Não-patogênico
WSP 02		+++	-	+	-	Não-patogênico
WSP 03		+++	+	+++	-	Baixo potencial patogênico
WSP 04		+++	+++	+	-	Baixo potencial patogênico
WSP 05		+++	+	+++	+	Potencialmente patogênico
WSP 06		+++	-	+++	-	Não-patogênico
WSP 07		+++	-	+++	+++	Baixo potencial patogênico
WSP 08		+++	-	+++	-	Não-patogênico
WSP 09		+++	+++	+	-	Baixo potencial patogênico
WSP 10		+++	+	+++	-	Baixo potencial patogênico
WSP 11		++	-	+++	-	Não-patogênico
WSP 12		+++	+	+	-	Baixo potencial patogênico
WSP 13		+++	+++	+	-	Baixo potencial patogênico
WSP 14		+++	+	+++	-	Baixo potencial patogênico
WSP 15		+++	-	+	-	Não-patogênico
WSP 16		+++	-	+++	-	Não-patogênico
WSP 17		+++	-	+++	-	Não-patogênico
WSP 18		+++	-	+	-	Não-patogênico
WSP 19		+++	+++	+++	-	Baixo potencial patogênico

Os isolados de referência da ATCC utilizados como controle nestes experimentos apresentaram os resultados esperados, *A. castellanii* Neff (ATCC 30010) não cresceu em concentração osmolar (1M de manitol) e temperatura elevada (42°C) demonstrando ser não-patogênico, enquanto *A. castellanii* T4 (ATCC 50492), obtido de um caso de ceratite, cresceu nessas condições, indicando seu potencial patogênico.

Alguns estudos como De Jonckhere (1983) e Khan e colaboradores (2002) demonstraram que isolados patogênicos de *Acanthamoeba* spp.



apresentam características de resistência a estes testes, mostrando a importância dos mesmos. Embora alguns isolados ambientais, tais como alguns apresentados neste trabalho, possam não ser patogênicos, eles têm grande importância epidemiológica, devido à habilidade destas amebas de atuarem como hospedeiro de bactérias patogênicas, como por exemplo: *Legionella* spp., *Mycobacterium avium*, *Listeria monocytogenes*, *Burkholderia pseudomallei*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* sorotipo O 157, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori* e *Afpia felis* (GREUB & RAOULT, 2004).

Estudos reportaram casos de isolamento de amebas não-patogênicas, as quais eram tolerantes a altas temperaturas, indicando que outros fatores além da tolerância à temperatura têm um importante papel na determinação da patogenicidade destas amebas (DE JONCKHEERE *et al.*, 1977; STEVENS *et al.*, 1980). Costa e colaboradores (2010) apresentaram um isolado pertencente ao grupo morfológico I de Pussard e Pons (1977), que teoricamente inclui espécies de *Acanthamoeba* que apresentam baixo ou nenhum potencial patogênico, e este mesmo isolado apresentou um crescimento significativamente maior a 42°C do que um isolado do grupo II. Deve-se ressaltar que o contrário também já foi descrito.

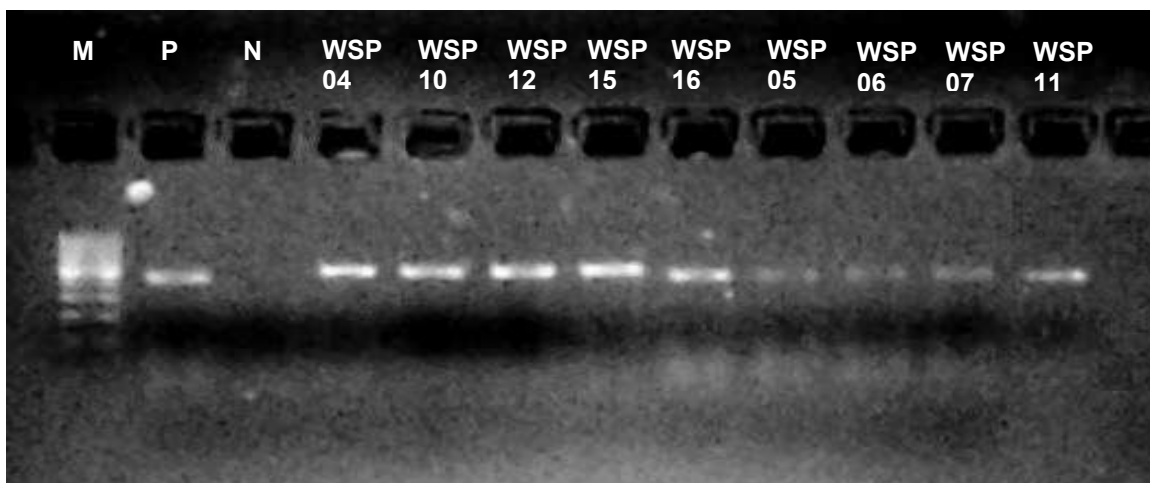
Do mesmo modo, o fato de um isolado apresentar ou não resistência às diferentes concentrações molares do meio, nem sempre pode ser usado como critério conclusivo sobre o seu potencial patogênico (CHAN *et al.*, 2011). Duarte e colaboradores (2013), por exemplo, demonstraram que três dos quatro isolados clínicos de *Acanthamoeba* analisados não foram tolerantes à concentração 1 M de manitol, apesar de terem sido isolados de lesões da

córnea de pacientes com ceratite amebiana. Todavia, levando em consideração o que foi proposto por Khan e colaboradores (2001), os isolados deste estudo que cresceram à concentração de 1 M de manitol poderiam ser considerados com potencial patogênico.

Atualmente, diversos ensaios são propostos em trabalhos no mundo inteiro, destacando-se aqueles que buscam a relação entre a patogenicidade de *Acanthamoeba* e outros determinantes, tais como: efeito citopático, testes de virulência *in vivo*, secreção de proteases, que deverão ser utilizados em experimentos futuros para avaliar o banco de isolados de *Acanthamoeba* formado a partir deste trabalho.

#### **4.5 Identificação molecular dos isolados de *Acanthamoeba***

Entre os 20 isolados obtidos no presente estudo, nove isolados (WSP 04, WSP 10, WSP 12, WSP 15, WSP 16, WSP 05, WSP 06, WSP 07 e WSP 11) foram confirmados com o uso da técnica da PCR como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* (Figura 11).



**Figura 11** – Produtos de amplificação da PCR do fragmento ASA.S1 do gene 18S rDNA. (M) Marcador de peso molecular (100bp), (P) controle positivo, (*A. castelanii*) (ATCC 30010), (N) controle negativo, (WSP 04 – WSP 11) isolados de água de piscinas térmicas.

Os resultados dos sequenciamentos dos produtos das PCR dos nove isolados pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*, foram comparados com sequências nucleotídicas parciais do gene 18S rDNA depositados no banco de dados GenBank utilizando o programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programa do US National Center for Biotechnology Information (NCBI) com o objetivo de buscar sequências similares.

Neste estudo, os genótipos mais prevalentes foram T15 e T4, conforme mostra a Tabela 5. Um dos nove genótipos encontrados revelou uma alta similaridade com as sequências do genótipo T5. A percentagem de similaridade entre a sequência obtida e a sequência T5 escolhida como referência foi de 97%. Três isolados estão intimamente relacionados ao genótipo T4 escolhido como referência, variando de 93% a 100% de similaridade. Quatro isolados mostraram uma alta similaridade com as sequências depositadas para o genótipo T15, variando entre 96% a 99% de similaridade com as sequências do genótipo T15 escolhidas como referência. E

um isolado apresentou 95% de similaridade com a sequência depositada para o genótipo T3 (Figura 12).

Tabela 5 – Análise da similaridade entre as sequências parciais do gene 18S rDNA de *Acanthamoeba* dos isolados de água de banheiras de hidromassagem e piscinas térmicas deste estudo e das registradas no GenBank.

Isolado	Genótipo	Acesso ao GenBank da sequência de referência	Similaridade (%)
WSP 04	T5	KJ531902.1	97%
WSP 12	T4	KF881887.1	99%
WSP 15	T15	KJ094648.1	99%
WSP 16	T15	KJ094648.1	98%
WSP 05	T15	GU573856.1	99%
WSP 06	T15	KJ094648.1	96%
WSP 07	T3	AF019053.1	95%
WSP 11	T4	HQ007038.1	100%

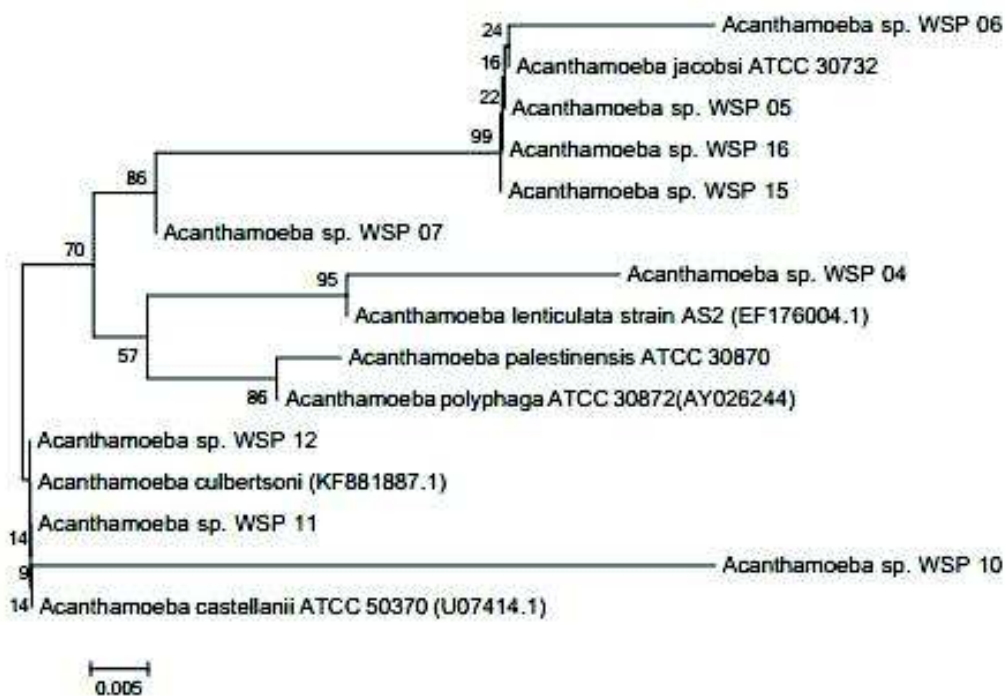


Figura 12 – Dendrograma do gene 18S rDNA do gênero *Acanthamoeba* incluindo os genótipos de referência e dos isolados sequenciados. Valores de Bootstrap (1000 repetições) são

mostrados acima e abaixo no dendrograma. Número de acesso do GenBank estão entre parênteses. Valor da barra de 0,005 substituições por posição de nucleotídeo.

No estudo de Huang & Hsu (2010), *Acanthamoeba* foi positiva em 11 amostras de águas termais (21,2%) e os seguintes genótipos foram determinados: T15 (n=4), T6 (n=3), T5 (n=2) e os genótipos T1, T2, T3 e T4 apenas umas vez. Kao e colaboradores (2012b), coletaram 211 amostras de água de duas bacias hidrográficas em Taiwan, onde *Acanthamoeba* estava presente em 34, sendo o genótipo T4 (n=19) o mais frequente, seguido pelo genótipo T5 (n=8) e posteriormente pelo genótipo T15 (n=3). Os genótipos T4, T5 e T15 de *Acanthamoeba* são considerados responsáveis pela ceratite amebiana e podem representar um risco à saúde dos seres humanos com atividades em ambientes aquáticos (KAO *et al.*, 2012b).

No Paquistão, Tanveer e colaboradores (2013), isolaram *Acanthamoeba* de diferentes fontes de água, onde encontraram diferentes genótipos de *Acanthamoeba*, entre eles os genótipos T4, T5 e T15. No estudo de Kiss e colaboradores (2014), foram coletadas 164 amostras de água de banheiras e piscinas termais de SPAS na Hungria e 6,7% foram positivas para *Acanthamoeba*, das quais sete isolados pertenciam aos genótipos T4 e dois ao genótipo T15. O genótipo T4 é particularmente importante, pois a maioria dos isolados de *Acanthamoeba* patogênicos aos seres humanos provaram pertencer ao genótipo T4 e acredita-se que sejam causadores de ceratite amebiana (*A. polyphaga*, *A. rhyodes*, *A. castellani* e *A. lugdunensis*) (YU *et al.*, 2004) e encefalite amebiana granulomatosa (*A. castellani* e *A. polyphaga*) (CASTELLANO-SANCHEZ *et al.*, 2003).

Na Itália, Cave e colaboradores (2014), analisaram o genótipo de 55 isolados de *Acanthamoeba* de amostras clínicas, e o genótipo T4 foi o mais frequente (n=33), seguido pelos genótipos T3 (n=11), T15 (n=10), e T11 (n=1). O genótipo T4 além de ser o mais frequentemente isolado de amostras ambientais, também predomina nas amostras clínicas. (BOOTON et al., 2005; KHAN, 2006; LEDEE et al., 2009a; MAGNET et al., 2012). Em relação ao genótipo T15, há relatos na literatura de ter sido isolado de diferentes fontes ambientais, com ampla distribuição geográfica (HEWETT et al., 2003; HUANG & HSU, 2010; TANVEER et al., 2013). O genótipo T3 é menos prevalente no ambiente em comparação com os genótipos T4 e T5 (LEEGE et al., 2009b). De acordo com Edagawa e colaboradores (2009), este genótipo é geralmente não patogênico. Poucos estudos relataram a associação do genótipo T3 com a ceratite amebiana (LEDEE et al., 1996; STOTHARD et al., 1998; ZHANG et al., 2004; MAGHSOOD et al., 2005; BOOTON et al., 2009; NAGYIVÁ et al., 2010).

No Brasil, alguns trabalhos relatam a distribuição genotípica de isolados de *Acanthamoeba*. Assim já foram identificados: o genótipo T4 em amostras de água potável; T3, T4 e T5 em amostras de poeira; T3, T4 e T5 em água de piscina; T4, T5 e T13 em amostras de solo e coleções de água; T4 e T11 em amostras de poeira; e T9 e T17 em amostras de rio e de reservatório, solo e húmus, por Magliano et al., (2009); Carlesso et al., (2010); Caumo & Rott (2011); Magliano (2011); Winck et al., (2011); Alves et al., (2012); Duarte et al., (2013) e Magliano et al., (2012), respectivamente.

O presente estudo indica que os genótipos T4 e T15 são os mais prevalentes em banheiras de hidromassagem e piscinas térmicas de SPAS e

clubes da cidade de Porto Alegre-RS. Foram encontrados genótipos de *Acanthamoeba* frequentemente isolados do ambiente e potencialmente patogênicos, o que representa um possível risco à saúde dos seres humanos em fontes aquáticas. O estudo confirma que a genotipagem de isolados de diferentes ambientes é importante para descrever a sua distribuição global, assim como a frequência de genótipos relacionados com a ceratite amebiana.

## 5. CONCLUSÕES

AVL do gênero *Acanthamoeba* foram isoladas da água de banheiras de hidromassagem e piscinas térmicas de Spas e Clubes da cidade de Porto Alegre, RS. A presença destes protozoários na água destes ambientes revela sua importância epidemiológica, uma vez que está em contato direto com os seres humanos.

A identificação morfológica dos cistos demonstrou ainda ser uma ferramenta importante na análise dos isolados quando não se utiliza o sequenciamento genético como ferramenta de classificação. No entanto, a associação das duas metodologias auxilia em uma classificação mais consistente.

Os isolados foram identificados por sua morfologia e por PCR como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* e foram caracterizados como pertencentes aos grupos morfológicos II e III.

A partir dos testes de osmotolerância e termotolerância foi demonstrando a possível presença de isolados patogênicos na água das banheiras de hidromassagem e piscinas térmicas analisadas.



Dos 20 isolados, nove foram confirmados pela técnica da PCR como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*. A frequência dos genótipos foi distribuída entre os perfis T3, T4, T5 e T15.

As informações que foram geradas por este estudo, poderão auxiliar posteriores entendimentos sobre a epidemiologia do gênero, determinação das espécies e genótipos mais comuns nos diferentes ambientes e quais isolados são ou não patogênicos, podendo causar risco à saúde de seres humanos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, Daniella de Souza Mendes Moreira. **Isolamento e caracterização morfológica de amebas de vida livre em amostras de solo e água de piscinas no distrito federal**. Brasília, 2006. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília.

ALVES, D.S.M.M.; MORAES, A.S.; NITZ, N.; OLIVEIRA, M.G.C.O.; HECHT, M.M.; GURGEL-GONÇALVES, R.; CUBA, C.A.C. Occurrence and characterization of *Acanthamoeba* similar to genotypes T4, T5, and T2/T6 isolated from environmental sources in Brasilia, Federal District, Brazil. **Experimental Parasitology**. 131, p. 239-244, 2012.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21st Edition, 2005.

ARANCE-GIL, A.; GUTIÉRREZ-ORTEGA, A.R.; VILLA-COLLAR, C.; NIETO-BONA, A.; LOPES-FERREIRA, D.; GONZÁLEZ-MEIJOME, J.M. Corneal cross-linking for *Acanthamoeba* keratitis in an orthokeratology patient after swimming in contaminated water. **Contact Lens & Anterior Eyes**. P. 1-4, 2013.

BARETE, S.; COMBES, A.; DEJONCKEERE, J.F.; DARTY, A.; VARNOUS, S.; MARTINEZ, V. *et al.* Fatal disseminated *Acanthamoeba lenticulata* infection in a heart transplant patient. **Emerg Infect Dis**. 13(5), p. 736–738, 2007.

BECKER-FINCO, A.; COSTA, A.O.; SILVA, S.K.; RAMADA, J.S., FURST, C. STINGHEN, A.E.; DE FIGUEIREDO, B.C.; DE MOURA, J.; ALVARENGA, L.M. Physiological, morphological and immunochemical parameters used for the characterization of clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba*. **Parasitology**. 140(3), p. 396-405, 2013.

BOOTON, G.C.; VISVESVARA, G.S.; BYERS, T.J.; KELLY, D.J.; FUERST, P.A. Identification and Distribution of *Acanthamoeba* Species Genotypes Associated with nonkeratitis Infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 1689-1693, 2005.

BOOTON, G.C.; JOSLIN, C.E.; SHOFF, M.; EY, T.U.; KELLY, D.J.; FUERST, P.A. Genotypic identification of *Acanthamoeba* sp. isolates associated with an outbreak of *Acanthamoeba* keratitis. **Cornea** 28, p. 673–676, 2009.

BRINDLEY, N.; MATIN, A.; KHAN, N.A. *Acanthamoeba castellanii*: high antibody prevalence in racially and ethnically diverse populations. **Exp. Parasitol.** v. 121, p. 254-256, 2009.

CARLESSO, A.M.; ARTUSO, G.L.; CAUMO, K.; ROTT, M.B. Potentially Pathogenic *Acanthamoeba* Isolated from a Hospital in Brazil. **Curr. Microbiol.**, v. 60, p. 185-190, 2010.

CASTELLANI, A. An amoeba found in cultures of yeast: preliminary note. **Journal of Tropical Medicine.** 33: 160. 1930.

CASTELLANO-SANCHEZ, A.; POPP, A.C.; NOLTE, F.S.; VISVESVARA, G.S.; THIGPEN, M.; REDEI, I.; SOMANI, J. *Acanthamoeba castellani* encephalitis following partially mismatched related donor peripheral stem cell transplantation. **Transpl Infect Dis** 5, p. 191–194, 2003.

CAUMO, K.; FRASSON, A.P.; PENS, C.J.; PANATIERI, L.F, FRAZZON, A.P.; ROTT, M.B. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. **Ann Trop Med Parasitol.** 103(6), p. 477-485, 2009.

CAUMO, K.; ROTT, M.B. *Acanthamoeba* T3, T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. **Acta Trop.** 117(3), p. 233-235, 2011.

CAVE, D.D.; D'ALFONSO, R.; COMLAVI, D.; ORAZI, C.D.; MONNO, R.; BERRILI, F. Genotypic heterogeneity based on 18S-rRNA gene sequences among *Acanthamoeba* isolates from clinical samples in Italy. **Experimental Parasitology.** p. 1-4, 2014.

CHAN, L.; MAK, J.; LOW, Y.; KOH, T.; ITHOI, I.; MOHAMED, S. M. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* spp. from air-conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. **Acta Tropica**, v. 117, p. 23–30, 2011.

CHAVES, C.M.; ROCHA, A.A.; MELHEM, M.S.C.; SANTOS, R.; FORONDA, A.S.; BARROS, L.S.P.; BARAZA, A.M.C. **Condições sanitárias de águas de piscinas de Campo Grande, Mato Grosso do Sul.** São Paulo, 1985. 116 p. Tese. Faculdade de Saúde Pública. Departamento de Saúde Ambiental, Universidade de São Paulo.

CORSARO, D.; VENDITTI, D. More *Acanthamoeba* genotypes: limits to the use of rDNA fragments to describe new genotypes. **Acta Protozool.** v. 50, p. 49-54, 2011.

COSTA, A. O.; CASTRO, E.A.; FERREIRA, G.A.; FURST, C.; CROZETA, M.A.; THOMAZ-SOCCOL, V. Characterization of *Acanthamoeba* Isolates from Dust of a Public Hospital in Curitiba, Parana, Brazil. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 57, p. 70-75, 2010.

CULBERTSON, C.G.; SMITH, J.; MINNER, J. *Acanthamoeba*: Observation on animal pathogenicity. **Science**, Washington, p. 127-1506, 1958.

DE CARLI, G. A. **Parasitologia Clínica - Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas**. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Atheneu, p. 156-206, 2001.

DE JONCKHEERE, J. Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and nonpathogenic isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 33, p. 751-757, 1977.

DE JONCKHEERE, J.F. Studies on pathogenic free-living amoebae in swimming pools. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, Paris, v. 77, p. 385-392, 1979a.

DE JONCKHEERE, J.F. Pathogenic free-living amoebae in swimming pools: a survey in Belgium. **Annales de Microbiologie**, Paris, v. 130B, p. 205-212, 1979b.

DE JONCKHEERE, J.F. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. **Applied Environmental Microbiology**. 39,p. 681–685, 1980.

DE JONCKHEERE, J.F. Pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba* spp. In thermally polluted discharges and surface waters. **J Protozool**. 28, p. 56-59, 1981.

DE JONCKHEERE J.F. Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing and taxonomy of the genus *Acanthamoeba*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Laurence, v. 30, 701-706, 1983.

DE JONCKHEERE, J.F. **Epidemiology**. In: EG Rondanelli (Ed.) **Infectious Diseases. Color Atlas Monographs. 1. Amphizoic Amoeba; Human Pathology**. Piccin: Nuova Libreria, Pavia, Italy; 127-147p (chap 5). 1987.

DE JONCKHEERE, J.F., Pathogenic free-living amoebae in swimming pools: survey in Belgium. **Annals de Microbiologie** (Paris) 130B, p. 205–212, 1993.

DEMIRCI, D.; OZDAMAR, A. A case of medication-resistant *Acanthamoeba* keratitis treated by corneal crosslinking in Turkey. **Case Reports in Ophthalmological Medicine**. P. 1-4, 2013.

DIAZ, J. K. Increasing Intracerebral Infections Caused by Free-Living Amebae in the United States and Worldwide. **J. Neuroparasitol.**, v. 1, p. 1-10, 2010.

DUARTE, J. L.; FURST, C.; KLISIEWICZ, D. R.; KLASSEN, G.; COSTA, A. O. Morphological, genotypic, and physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates from keratitis patients and the domestic environment in Vitoria, Espírito Santo, Brazil. **Exp Parasitol**. 135(1), p.9-14, 2013.

EDAGAWA, A.; KIMURA, A.; KAWABUCHI-KURATA, T.; KUSUHARA, Y.; KARANIS, P. Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba*

and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. **Parasitol. Res.** 105, p. 1109–1117, 2009.

ETTINGER, M.R.; WEBB, S.R.; HARRIS, S.A.; MCININCH, S.P.; GARMAN, G.; BROWN, B.L.; Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA. **Parasitology Research**, Berlin, v. 89, p. 6-15, 2003.

FERNANDEZ, M.C.A.; CRESPO, E.P. Las amebas de vida libre o anfizoica (Protozoa, Lobosea). In: Durán MLS. Avances en parasitología. Santiago de Compostela (Espanha): **Servicio de Publicaciones de la Universidade de Santiago de Compostela**.143-162, 1992.

FOUQUE, E.; TROUILHE, M.; THOMAS, V.; HARTEMANN, P.; RODIER, M.; HECHARDA, Y. Cellular, Biochemical, and Molecular Changes during Encystment of Free-Living Amoebae. **Eukaryot. Cell.**, v. 11, p. 392-387, 2012.

FOWLER, M.; CARTER, R.F.; Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp: a preliminary report. **Br Med J.** v. 2, p. 740-742, 1965.

GELMAN, B.B.; RAUL, S.J.; NADER, R.; POPOV, V.; BOKOWSKI, J. CHLJUB, G.; *et al.* Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. **JAMA**, v. 285, p. 2450-2541, 2001.

GIANINAZZI, C.; SCHILD, M.; WÜTHRICH, F.; MÜLLER, N.; SCHURCH, N.; GOTTSTEIN, B. Potentially human pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a heated indoor swimming pool in Switzerland. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 121, p. 180-186, 2009.

GIANINAZZI, C.; SCHILD, M.; ZUMKEHRM B.; WÜTHRICH, F.; NUESCH, I. Screening of Swiss hot spring resorts for potentially pathogenic free-living amoebae. **Experimental Parasitology.** v. 126,p. 45-53, 2010.

GÓRNIK, K.; KUŻNA-GRYGIEL, W. Presence of virulent strains of amphizoic amoebae in swimming pools of the city of Szczecin. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Poland, v. 11, p. 233-236, 2004.

GREUB G.; RAOULT, D. Micoorganisms resistant to free-living amoebae. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, p. 413-433, 2004.

GRIFFIN. J.L. Temperature tolerance of pathogenic and nonpatogenic free-living amoebas. **Science**, Washington, v. 178, p. 869-70, 1972.

HEWETT, M.K.; ROBINSON, B.S.; MONIS, P.T.; SAINT, C.P. Identification of a new *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae). **Acta Protozool.** 42, p. 325-329, 2003.

HSU, B.M.; LIN, C.L.; SHIH, F.C. Survey of pathogenic free-living amoebae and *Legionella* spp. in mud spring recreation area. **Water Research**. p. 1-12, 2012.

HUANG, S.W.; HSU, B.M. Isolation and identification of *Acanthamoeba* from Taiwan spring recreation areas using culture enrichment combined with PCR. **Acta Tropica**. 115, p. 282-287, 2010.

ILLINGWORTH, C.D.; COOK, S.D.; KARABATSAS, C.H.; EASTY, D.L. *Acanthamoeba* keratitis: risk factors and outcome. **Br J Ophthalmol**. 9(12), p. 1078-82, 1995.

INIT, I.; LAU, Y.L.; ARIN, F.A.; FOEAD, A.I.; NEILSON, R.S.; NISSAPATORN, V. Detection of free living amoebae, *Acanthamoeba* and *Naegleria*, in swimming pools, Malaysia. **Trop. Biomedicine**, 27(3), p. 566-577, 2010.

JAGER, B.V.; STAMM, W.P. Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. **Lancet**. v. 23, n. 2, p. 1343-1345, 1972.

JONES, D.B.; VISVESVARA, G.S.; ROBINSON, N.R. (1975) *Acanthamoebae polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. **Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom**, London, v. 1075, p. 221-232, 1975.

KAO, P.M.; HSU, B.M.; CHEN, N.H.; HUANG, K.H.; HUANG, S.W.; KING, K.L.; CHIU, Y.C. Isolation and identification of *Acanthamoeba* species from thermal spring environmental in southern Taiwan. **Experimental Parasitology**. 130, p.354-358, 2012a.

KAO, P.M.; HSU, B.M.; CHEN, N.H.; HUANG, K.H.; HUANG, C.C.; JI, D.D.; CHEN, J.S.; LIN, W.C.; HUANG, S.W.; CHIU, Y.C. Molecular detection and comparison of *Acanthamoeba* genotypes in different functions of watersheds in Taiwan. **Environ Monit Assess**. 184, p. 4335-4344, 2012b.

KAO, P.M.; TUNG, M.C.; HSU, B.M.; HSUEH, C.J.; CHIU, Y.C.; CHEN, A.H.; SHEN, S.M.; HUANG, Y.L. Occurrence and distribution of *Naegleria* species from thermal spring environmental in Taiwan. **Lett Appl Microbiol**. 56(1), p. 1-7, 2013.

KHAN, N.A.; JARROLL, E. L.; PAGET, T. A. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. **Current Microbiology**, New York, v. 43, p. 204-208, 2001.

KHAN, N. A; JARROLL, E. L; PAGET, T. A. Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. **Current Microbiology**, New York, v. 45, n. 3, p. 197-202, 2002.

KHAN, N.A.; TAREEN, N.K. Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and pathogenicity-based categorization of *Acanthamoeba* strains. **Folia Parasitol.** v. 50, p. 97-104, 2003.

KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 30, p. 564-595, 2006.

KHAN, N.A. *Acanthamoeba* invasion of the central nervous system. **International Journal of Parasitology.** v. 37, p. 131-138, 2007.

KILVINGTON, S.; WHITE, D.G. Rapid identification of thermophilic *Naegleria*, including *Naegleria fowleri* using API ZYM system. **J Clin Pathol.** 38(11), p. 1289-1292, 1985.

KILVINGTON, S.; GRAY, T.; DART, J.; MORLET, N.; BEECHING, J.R.; FRAZER, D.G.; MATHESON, M. *Acanthamoeba* keratitis: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. **Investigative ophthalmology & visual science**, Brookline, v. 45, p. 165-169, 2004.

KISS, C.; BARNA, Z.; VARGHA, M.; TOROK, J.K. Incidence and molecular diversity of *Acanthamoeba* species isolated from public baths in Hungary. **Parasitol Res.** 113, p. 2551-2557, 2014.

KUHLENCORD, A., MERGERIAN, H., BOMMER, W. Studies on the pathogenesis of *Acanthamoeba*-associated meningoencephalitis. **Zentralblatt für Bakteriologie.** 271, p. 256–260, 1989.

LANDELL, M.F.; SALTON, J.; CAUMO, K.; BROETTO, L.; ROTT, M.B. Isolation and genotyping of free-living environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. from bromeliads in Southern Brazil. **Experimental Parasitology.** 134, p. 290-294, 2013.

LEDEE, D.R.; HAY, J.; BYERS, T.J.; SEAL, D.V.; KIRKNESS, C.M. *Acanthamoeba griffini*. Molecular characterization of a new corneal pathogen. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 37, p. 544–550, 1996.

LEDEE, D.R.; IOVIENO, A.; MILLER, D.; MANDAL, N.; DIAZ, M.; FELL, J.; FINI, M.E.; ALFONSO, E.C. Length and sequence heterogeneity in the mitochondrial internal transcribed spacer of *Acanthamoeba* spp. **Cell Physiol.** 221, p. 402-411, 2009a.

LEDEE, D.R.; IOVIENO, A.; MILLER, D.; MANDAL, N.; DIAZ, M.; FELL, J.; FINI, M.E.; ALFONSO, E.C. Molecular identification of T4 and T5 genotypes in isolates from *Acanthamoeba* keratitis patients. **J Clin Microbiol.** 47, p.1458-1462, 2009b.

LORENZO-MORALES, J.; ORTEGA-RIVAS, A.; MARTÍNEZ, E.; FORONDA, P.; VALLADARES, B. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba*

strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. **Parasitology Research**, Berlin, v. 95, p. 273-277, 2005a.

LORENZO-MORALES, J.; LINDO, J.F.; MARTINEZ, E.; CALDER, D.; FIGUERUELO, E.; VALLADARES, B.; ORTEGA-RIVAS, A. Pathogenic *Acanthamoeba* strains from water sources in Jamaica, West Indies. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 99, p. 751–758, 2005b.

MAGHSOOD, A.H.; SISSONS, J.; REZAIAN, M.; NOLDER, D.; WARHURST, D.; KHAN, N.A. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. **J. Med. Microbiol.** 54, p. 755–759, 2005.

MAGLIANO A.C.M.; SILVA, F.M.; TEIXEIRA, M.M.G.; ALFIERI, S.C. Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. isolated from tap water in Brazil. **Exp. Parasitol.**, v. 123, p. 231-235, 2009.

MAGLIANO A. C. M. Diversidade de *Acanthamoeba* spp no Brasil: isolamento, aspectos fisiológicos, genotipagem e relações filogenéticas entre isolados de ambiente e de casos clínicos. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MAGLIANO A.C.M.; TEIXEIRA, M.M.G; ALFIERI, S.C. Revisiting the *Acanthamoeba* species that form star-shaped cysts (genotypes T7, T8, T9, and T17): characterization of seven new Brazilian environmental isolates and phylogenetic inferences. **Parasitology**, v. 139, p. 45–52, 2012.

MAGNET, A.; GALVÁN-DIAZ, A.L.; FENOY, S.; IZQUIEDO, F.; RUEDA, C.; FERNANDEZ, V.C.; PÉREZ-IREZÁBAL, J.; BANDYOPADHYAY, K.; VISVESVARA, G.S.; DA SILVA, A.J.; DEL AGUILA, C. Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates. **Parasitol Res.** 111, p. 383-392, 2012.

MAGNET, A.; HENRIQUES-GIL, N.; GALVÁN-DIAZ, A.L.; IZQUIEDO, F.; FENOY, S.; DEL AGUILA, C. Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. **Parasitol Res.** 113, p. 2845-2850, 2014.

MAHMOUDI, M.R.; TAGHIPOUR, N.; EFTEKHAR, M.; HAGHIGHI, A.; KARANIS, P. Isolation of *Acanthamoeba* species in surface waters of Gilan province-north of Iran. **Parasitol Res.** 110(1), p. 473-477, 2012.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 2, p. 273-307, 2003.

MARTINEZ, A.J. Infection of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. **Rev Infect Dis.** v. 13 p. 399–402, 1991.



MARTINEZ, A.J.; VISVESVARA, G.S. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. **Brain Pathology**. v. 7, n. 1, p. 583-598, 1997.

MOURA, H. **Amebas de vida livre em piscinas: isolamento, identificação, potencial patogênico**. Rio de Janeiro, 1980. 79 p. Dissertação de Mestrado - Instituto Oswaldo Cruz

MUÑOZ, V.; REYES, H.; TOCHE, P.; CARCAMO, C.; GOTTLIEB, B. Aislamiento de amebas de vida libre en piscinas publicas de Santiago de Chile. **Parasitol. Latinoam.**, v. 58, p. 106 – 111, 2003.

NAGINGTON, J.; WATSON, P. G.; PLAYFAIR, T. J.; MCGILL, J.; JONES, B. R.; STEELE, A. D. Amoebic infections of the eye. **Lancet**, London, v. 28, n. 2, p. 1537–1540, 1974.

NAGYOVA, V.; NAGY, A.; TIMKO, J. 2010. Morphological, physiological and molecular biological characterisation of isolates from first cases of *Acanthamoeba* keratitis in Slovakia. **Parasitol. Res.**, v. 106, p. 861–872, 2010.

NUPRASERT, W.; PUTAPORNTIP, C.; PARIYAKANOK, L.; JONGWUTIWES, S. Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. **J. Clin. Microbiol.** v. 48, p. 4636-4640, 2010.

OBEID, W.N.; ARAÚJO, R.; VIEIRA, L.A.; MACHADO, M.A.C. Ceratite bilateral por *Acanthamoeba* – **Relato de caso. Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. São Paulo, v. 66, n. 6, 2003.

PAGE, F.C. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. **The Journal of Protozoology**, New York, v. 14, n. 4, p. 709–724, 1967.

PAGE, F.C., A New Key to Freshwater and Soil Amoebae. **Freshwater Biological Association Scientific Publications**, Cumbria, UK. 122p, 1988.

POSSAMAI, Cynara Oliveira. Classificação morfológica, genotipagem e avaliação de patogenicidade de isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba* em Vitória e região metropolitana (ES). Vitória, 2012. 124p. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas). Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Espírito Santo.

PUSSARD, M.; PONS, R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). **Protistologica**, Dijon, v. 13, p. 557-598, 1977.

REYES-BATLE, M.; TODD, C.D.; MARTÍN-NAVARRO, C.M.; LÓPOEZ-ARENCIBIA, A.; CABELLO-VILCHEZ, A.M.; GONZÁLEZ, A.C.; CÓRDOBA-

LANÚS, E.; LINDO, J.; VALLADARES, B.; PIÑERO, J.E.; LORENZO-MORALES, J. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. **Parasitol Res.** 113, p. 1383-1388, 2014.

RIVERA, F.; LARES, F.; GALLEGOS, E.; RAMIREZ, E.; BONILLA, P.; CALDERON, A.; MARTINEZ, J.J.; RODRIGUEZ, S.; ALCOCER, J. Pathogenic amoebae in natural thermal water of three resorts of Hidalgo, Mexico. **Environ Res.** 50(2), p. 171-182, 1989.

RIVERA, F.; RAMÍRES, E.; BONILLA, P.; CALDERÓN, A.; GALLAGOS, E.; RODRÍGUEZ, S.; ORTIZ, R.; ZALDÍVAR, B.; RAMÍREZ, P.; DURÁN, A. Pathogenic and free-living amoebae isolated from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. **Environmental Research**, New York, v. 62, p. 43-52, 1993.

RUTHES, A.C.C.; WAHAB, S.; WAHAB, N.; MOREIRA, H.; MOREIRA, L. Conjuntivite presumível por *Acanthamoeba*. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 67, p. 897-900, 2004.

SALAH, M.; ICIAR, M. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.

SALAZAR, H.C.; MOURA, H.; RAMOS, R.T. Isolamento de amebas de vida livre a partir de água mineral engarrafada. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 16, n. 5, 1982.

SAWYER, T.K.; GRIFFIN, J.L.; A proposed new family, *Acanthamoebidae*, n. fam. (order Amoebida) for certain cyst-forming filose amoebae. **Trans Am Microsc Soc.** 94(1), p. 93-98, 1975.

SCAGLIA, M.; STROSSELLI, M.; GRAZIOLI, S.; BERNUZZI, A.M.; DE JONCKHEERE, J.F. Isolation and Identification of Pathogenic *Naegleria australiensis* (*Amoebida*, *Vahlkampfiidae*) from a Spa in Northern Italy. **Applied and Environmental Microbiology**. P. 1282-1285, 1983.

SCHUSTER, F.L. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amoebae. **Clinical Microbiology reviews.** v. 15, p. 342-354, 2002.

SCHUSTER, F. L; VISVESVARA, G. S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, p. 1001–1027, 2004.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N.A. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. **Parasites & Vectors.** 5:6, p. 1-13, 2012.

SILVA, M.A.; ROSA, J.A. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. **Rev. Saúde Pública**, v. 37, p. 242-246, 2003.

SINGH, B.N.; DAS, S.R. Intra-nasal infection of mice with flagellate stage of *Naegleria aerobia* and its bearing on the epidemiology of human meningoencephalitis. **Curr Sci.** 41, p. 625-628, 1972.

STEVENS, A.R., WILLAERT E. Drug sensitivity and resistance of four *Acanthamoeba* species. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 74, p. 806-808, 1980.

STOTHARD, D.R.; SCHROEDER-DIEDRICH, J.M.; AWWAD, M.H.; GAST, R.J.; LEDEE, D.R.; RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S.; DEAN, C.L.; FUERST, P.A.; BYERS, T.J. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 45, p. 45-54, 1998.

TANVEER, T.; HAMEED, A.; MUAZZAM, A.G.; JUNG, S.Y.; GUL, A.; MATIN, A. Isolation and molecular characterization of potentially pathogenic *Acanthamoeba* genotypes from diverse resources including household drinking water from Khyber Paktunkhwa, Pakistan. **Parasitol Res.** 112, p. 2925-2932, 2013.

TRABELSI, H.; DENDANA, F.; SELLAMI, A.; SELLAMI, H.; CHEIKHROUHOU, F.; NEJI, S.; MAKNI, F.; AYADI, A. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. **Pathologic Biologie** (Paris), 60(6), p. 399-405, 2012.

TSVETKOVA, N.; SCHILD, M.; PANAIOTV, S.; KURDOVA-MINTCHEVA, R.; GOTTSTEIN, B.; WALOCHNIK, J.; ASPOCK, H.; LUCAS, M.S.; MULLER, N. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. **Parasitology Research**, Berlin, v. 92, p. 405-413, 2004.

VISVESVARA, G.S.; MARTINEZ, A.J.; SCHUSTER, F.L.; LEITCH, G.J.; WALLACE, S.V.; SAWYER, T.K.; Leptomyxid ameba, a new agent of amebic meningoencephalitis in humans and animals. **J. Clin. Microbiol.** v. 12, n. 28, p. 2750-2756, 1990.

VISVESVARA, G.S.; SHER-GREEN, J. Epidemiology of free-living ameba infection. **The Journal of Protozoology**. New York, v. 37, p. 25-33, 1990.

VISVESVARA, G.S. Classification of *Acanthamoeba*. **Reviews of infectious diseases**, Chicago, v. 13, p. 369-372, 1991.

VISVESVARA, G.S.; SCHUSTER, F.L.; MARTINEZ, A.J. *Balamuthia mandrillaris*, N.G., N. So., agent of amebic meningoencephalitis in human and other animals. **J Euk Microbiol.** v.40, n.4, p. 504-514, 1993.

VIVESVARA, G. S.; MAGUIRE, J.H. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae. *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. **Trop. Infect. Dis.**, v. 2, p. 1114-1125, 2006.

VISVESVRA, G.S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F.L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 50, p.1-26, 2007.

VISVESVARA, G.S.; SCHUSTER, F.L. Opportunistic Free-living Amebae, Part I. **Clinical Microbiology Newsletter**, Boston, v. 30, p. 151-158, 2008a.

VISVESVARA, G.S.; SCHUSTER, F.L. Opportunistic free-living amoebae, Part II. **Clinical Microbiology Newsletter**, Boston, v. 30, p. 159-166, 2008b.

VOLKONSKY, M. *Hartmannella castelanii*. Douglas et classification des Hartmannelles. **Arch Zool Exp Gen.** 72, p. 317-339, 1931.

WALOCHNIK, J.; OBWALLER, A.; ASPÖCK, H. Correlations between morphological, molecular, biological and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 4408–4413, 2000.

WINCK, M.A.; CAUMO, K.; ROTT, M.B. Prevalence of *Acanthamoeba* from tap water in Rio Grande do Sul, Brazil. **Curr Microbiol.** 63(5), p. 464-469, 2011.

ZHANG, Y.; SUN, X.; WANG, Z.; LI, R.; LUO, S.; JIN, X.; DENG, S.; CHEN, W. Identification of 18S ribosomal DNA genotype of *Acanthamoeba* from patients with keratitis in North China. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 45, p. 1904–1907, 2004.

YU, H.S.; KONG, H.H.; KIM, S.Y.; HAHN, Y.H.; HAHN, T.W.; CHUNG, D.I. Laboratory investigation of *Acanthamoeba lugdunensis* from patients with keratitis. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 45, p. 1418–1426, 2004.

## 7. ANEXOS

### **ANEXO A – Meios de cultura e soluções utilizadas**

#### **7.1 Solução Salina de Page**

120 mg de cloreto de sódio (NaCl)

4 mg de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O)

142 mg de hidrogenofosfato dissódico anidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

136 mg diidrogenofosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

4 mg de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O)

Água destilada q.s.p 1000mL

Preparo: Todos os componentes foram dissolvidos na ordem apresentada, com exceção do CaCl<sub>2</sub> que foi dissolvido separadamente e adicionado posterior ao resfriamento da solução. O pH foi ajustado em 6,5 ± 0,2 e a solução esterilizada por autoclavagem (121°C por 15min).

#### **7.2 Ágar não-nutriente (ANN)**

100mL de solução salina de Page (1X)

1,5 g de Agar

Preparo: O ágar foi dissolvido em 100mL da solução salina, aquecida até a completa dissolução e esterilizado por autoclavagem (121°C por 15min). A distribuição do ANN foi realizada em placas bacteriológicas estéreis.

### 7.3 Meio Proteose Peptona Extrato de Levedo e Glicose (PYG) pH

**6,5 ± 0,2**

7,5 g de Proteose Peptona

0,75 g de Extrato de levedo

0,98 g de Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

0,059 g de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

1g de Citrato de sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

0,02g de Sulfato ferroso amoniacal [ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ]

0,034g de Diidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

0,355g de Hidrogenofosfato dissódico anidro

15g de Glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )

Água destilada q.s.p 1000 mL

Preparo: Todos os componentes foram dissolvidos na ordem apresentada, com exceção do  $\text{CaCl}_2$  que foi dissolvido separadamente e adicionado posterior ao resfriamento da solução. O pH foi ajustado em 6,5 ± 0,2 e a solução esterilizada por autoclavagem (121 °C por 15 min).

**ANEXO B – Ofício de Autorização****Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente**

Projeto de mestrado: “Isolamento e Identificação de Amebas de Vida Livre em SPAS e Piscinas Térmicas localizados em Porto Alegre, RS - Brasil”.

Laboratório de Parasitologia

Departamento de Microbiologia

Aluna: Laura Fuhrich Fabres

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilise Brittes Rott

Telefone para contato: (51) 3308 3584

A água é um habitat potencial para diversos microrganismos, dentre eles, os protozoários de vida livre. O presente trabalho tem como objetivo verificar a presença de organismos de vida livre nas águas de banheira de hidromassagem e piscinas térmicas em SPAS e Clubes de Porto Alegre, bem como caracterizá-los. A pesquisa contribuirá para o melhor conhecimento sanitário destes ambientes.

Vimos solicitar através deste a permissão para realização de coletas de água de hidromassagem e piscina térmica do presente SPA/Clube. Enfatizamos que a participação é voluntária e garantimos o **sigilo dos resultados**, os quais estarão à disposição do estabelecimento para consultas.

Aguardamos a análise da solicitação e autorização para realizar as respectivas coletas.

Atenciosamente,

---

Assinatura do orientador

---

Assinatura do responsável pela autorização