

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Acanthamoeba* sp. (SARCOMASTIGOPHORA: SARCODINA) DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)

Dayane Andriotti Otta¹; Marilise Brittes Rott²; Éder Moraes Saucedo¹; Ana Maris Carlesso¹; Onilda Santos da Silva²

¹Estudantes do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; E-mail: dayaneotta@gmail.com; ²Professores do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, setor de Parasitologia. E-mail: onilda.silva@ufrgs.br

Resumo – O gênero *Acanthamoeba* enquadra-se entre os protozoários de maior prevalência no meio ambiente. Estudos anteriores demonstram a capacidade de *Acanthamoeba polyphaga* em desenvolver-se no intestino de larvas e adultos de *Aedes aegypti* em condições de laboratório. Entretanto, a susceptibilidade de mosquitos de origem silvestre à infecção por esta ameba de vida livre (AVL), ainda não foi investigada. O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de *Acanthamoeba* sp. em populações naturais de *Ae. aegypti* e caracterizar as amebas isoladas. As larvas de *Ae. aegypti* foram obtidas com o auxílio de armadilhas de oviposição. A presença de cistos e trofozoítos de amebas de vida livre foi investigada em *pools* de larvas saudáveis pertencentes ao 3º e 4º estágio, após identificação e um rigoroso processo de lavagem. As larvas foram maceradas e centrifugadas, e um inóculo de 50 µL do sedimento foi depositado no centro da placa contendo ágar não-nutriente a 1,5%, com uma sobrecamada de *Escherichia coli* (ATCC 25922) mortas pelo calor a 56°C, para o isolamento e cultivo de amebas. O procedimento foi realizado em triplicata. Até o momento, foram realizadas cinco coletas distintas de culicídeos, onde aspectos morfológicos evidenciaram a presença de *Ae. aegypti*. AVL foram isoladas em todos os *pools* analisados, cuja caracterização morfológica sugere a ocorrência do gênero *Acanthamoeba*. AVL possivelmente pertencente ao gênero *Acanthamoeba* é capaz de infectar populações naturais de *Ae. aegypti*.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; *Acanthamoeba* sp.; isolamento; caracterização.

Introdução

Aedes aegypti é considerado o mosquito vetor mais importante dos sorotipos virais DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 que ocasionam a dengue clássica e a sua forma hemorrágica (Gubler, 2001). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a infecção pode acometer anualmente 50 milhões de pessoas no mundo. Por exemplo, em 2009 foram reportados 853.468 casos na região das Américas, incluindo 20.832 episódios correspondentes à dengue hemorrágica (World Health Organization, 2009a, b).

É importante ressaltar a dificuldade existente em realizar o controle populacional deste mosquito, uma vez que possui um ciclo de vida particular, bem como uma fácil adaptação ao ambiente. Por estas razões, a busca por meios de controle mais eficientes e específicos vêm aumentando, sendo imprescindíveis estudos acerca da atividade de possíveis agentes biológicos, os quais reduzem naturalmente a população de mosquitos. Embora existam muitos avanços científicos, até o momento há uma lacuna relevante acerca de alguns protozoários e seu grau de nocividade a culicídeos.

O gênero *Acanthamoeba* enquadra-se entre os protozoários de maior prevalência no meio ambiente. É bem distribuído em todo o mundo e já foi isolado do solo, poeira, água tratada e natural, piscinas, lentes de contato, entre outros (Salazar et al., 1982; Lorenzo-Morales et al., 2005; Carlesso et al., 2007; Pens et al., 2008; Caumo et al., 2009; Kawaguchi et al., 2009).

Estudos preliminares demonstram a capacidade de *Acanthamoeba polyphaga* em desenvolver-se no intestino de larvas e adultos de *Ae. aegypti* em condições de laboratório (Rott et al., 2010). Entretanto, a susceptibilidade de mosquitos de origem silvestre à infecção por este parasito ainda não foi investigada, não havendo, portanto, estimativas de sua prevalência. Deste modo, objetivou-se avaliar a ocorrência de *Acanthamoeba* sp. em populações naturais de *Aedes aegypti*, além de caracterizar os isolados obtidos.

Materiais e Métodos

A coleta de larvas de *Ae. aegypti* foi feita em cinco bairros distintos de Porto Alegre, RS: Camaquã, Cavalhada, Cristal, Jardim Vila Nova e Santa Tereza, com o auxílio de armadilhas de oviposição (ovitrampas).

As larvas utilizadas no experimento passaram por um rigoroso processo de lavagem, seguido de maceração. Após, as mesmas foram centrifugadas e 50 µL do sedimento, em triplicata, foi depositado no centro da placa de ágar não-nutriente a 1,5%, com uma sobrecamada de *Escherichia coli* (ATCC 25922) mortas pelo calor a 56°C, para o isolamento de amebas de vida livre. As placas foram vedadas com filme plástico (Parafilm®) e mantidas em estufa, a 30°C. Após 48 horas, as placas foram analisadas ao microscópio óptico (100X) por até 10 dias. A caracterização morfológica dos isolados de *Acanthamoeba* seguiu os critérios propostos por Page (1988).

Para a exclusão do gênero *Naegleria fowleri*, foi realizada a técnica de exflagelação, que consiste na adição de 10 mL de água destilada estéril sobre cada placa de ágar não-nutriente com crescimento de amebas de vida livre e observação por até 1h em microscópio óptico (100X) para verificar a emissão de flagelos.

Como parte da caracterização dos isolados de *Acanthamoeba* sp., avaliou-se o tempo de contração do vacúolo pulsátil de cada amostra, em microscópio óptico (100X) (De Carli, 2001), além da realização de testes de osmotolerância e termotolerância, de acordo com Khan et al. (2001).

Resultados e Discussão

Das cinco coletas de larvas de *Ae. Aegypti* realizadas, todas apresentaram, nos pools, amebas de vida livre com características morfológicas sugestivas do gênero *Acanthamoeba*. A figura 1 mostra um isolado com típico crescimento de AVL possivelmente do gênero *Acanthamoeba* em placa de ágar não-nutriente a 1,5%, recoberto com *Escherichia coli*.

Os testes de exflagelação foram negativos para os cinco isolados de amebas de vida livre, indicando que não há a presença de *Naegleria fowleri* entre as amostras estudadas. Neste gênero amebiano, os trofozoítos possuem a capacidade de se transformar em estruturas flageladas, possuindo, tipicamente, dois flagelos anteriores, embora três ou quatro flagelos possam ser visualizados ocasionalmente (Visvesvara & Schuster, 2008).

Em todas as amostras foi possível verificar a nítida presença de vacúolos pulsáteis, cujo tempo de contração é mostrado na tabela 1.

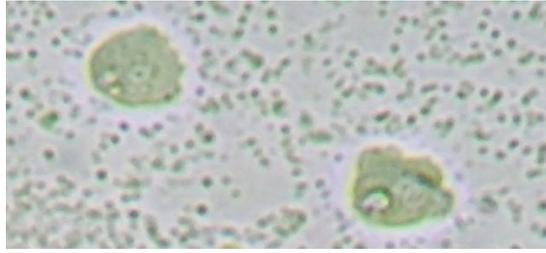


Figura 1: Trofozoítos de AVL provavelmente pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* da amostra do bairro Santa Tereza (Microscópio óptico 100X).

Tabela 1. Tempo de contração de vacúolos de amebas de vida livre isoladas de *Ae. aegypti*.

Isolados (de acordo com bairro de origem)	Tempo de contração médio (em segundos) ^a
Camaquã	37,2
Cavanhada	31,1
Cristal	27,2
Jardim Vila Nova	32,8
Santa Tereza	36,4

^a10 trofozoítos por amostra.

Analisando-se os testes de tolerância à temperatura e ao manitol, todos os isolados apresentaram crescimento a 30°C (controle), 37°C e 0,5 M de manitol. Nenhuma amostra apresentou crescimento a 42°C e 1,0 M de manitol. Estes resultados evidenciam que, diante da incapacidade de adaptação à elevada temperatura e concentração osmolar, os isolados podem ser isentos de patogenicidade para humanos e outros mamíferos, de acordo com sugestão de Khan et al. (2001).

Conclusões

O gênero *Acanthamoeba* é capaz de infectar populações naturais de *Ae. aegypti*. O prosseguimento do presente trabalho, com um maior número amostral e confirmação dos isolados através de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) fornecerá importantes informações acerca da prevalência desta ameba de vida livre em culicídeos vetores. Desta forma, servirá como subsídio para posteriores pesquisas sobre a interação e o possível impacto do microorganismo sobre o ciclo de vida de *Ae. aegypti*.

Referências

- CARLESSO, A. M. et al. Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes de hospital público da cidade de Porto Alegre, RS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 3, p. 316-320, maio-jun. 2007.
- CAUMO, K. et al. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 103, n. 6, p. 477-485, sept. 2009.
- DE CARLI, G. A. **Parasitologia Clínica** - Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. 2ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, p. 156-206, 2001.
- GUBLER, D. J. Human arbovirus infections worldwide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, p. 13-24, dec. 2001.

KAWAGUCHI, K. et al. Prevalence of *Helicobacter* and *Acanthamoeba* in natural environment. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 4, p 465-471, apr. 2009.

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, sep. 2001.

LORENZO-MORALES, J. et al. Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Poland, v. 12, n. 2, p. 233-236, 2005.

PAGE, F. C. **A new key to freshwater and soil Gymnamoebae**. Ambleside: Freshwater Biological Association, Cumbria, 1988. 122p.

PENS, C. J. et al. *Acanthamoeba* spp. and bacterial contamination in contact lens storage cases and the relationship to user profiles. **Parasitology Research**, Berlin, v. 103, n. 6, p. 1241-1245, nov. 2008.

ROTT, M. B. et al. Susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to *Acanthamoeba polyphaga* (Sarcomastigophora: Acanthamoebidae). **Parasitology Research**, Berlin, v. 107, n. 1, p. 195-198, jun. 2010.

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, out. 1982.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Fact sheet N°117. Mar. 2009a. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 19 fev. 2010.

_____. Situação del dengue en las Américas en el 2009. 2009b. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/dengue/es/>>. Acesso em: 19 fev. 2010.