

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

KARIN SILVA CAUMO

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Acanthamoeba* EM ÁGUA DE PISCINAS
DA CIDADE DE PORTO ALEGRE, RS**

PORTO ALEGRE

2009

KARIN SILVA CAUMO

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Acanthamoeba* EM ÁGUA DE PISCINAS
DA CIDADE DE PORTO ALEGRE, RS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marilise Brittes Rott
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes
Frazzon

PORTO ALEGRE

2009

AGRADECIMENTOS

Quero primeiramente agradecer a Deus, que me deu inspiração e vontade de buscar cada dia ser melhor e fazer um trabalho melhor, que esteve comigo em todos os momentos dando-me paciência e determinação para a concretização de meus projetos.

À Dr^a. Marilise Brittes Rott, minha orientadora, pela sua dedicação e confiança, pelo apoio e por todas as oportunidades proporcionadas de aprendizagem e incentivo. Sua ética científica, sua habilidade de ensinar e o seu empenho incansável em aprimorar o conhecimento serviram-me de exemplo como profissional e professor a ser seguido.

À Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon, minha co-orientadora, pela sua amizade, incentivo e generosidade sem limites na entrega de seus conhecimentos que tornaram possíveis a concretização deste projeto na parte de biologia molecular.

Às minhas queridas amigas e bolsistas de iniciação científica, Amanda Piccoli Frasson e Lua Ferreira Panatieri, sem elas o trabalho seria muito mais difícil.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente em especial ao Prof^o e Coordenador José Carlos Germani, pelo seu empenho em buscar melhorias para a realização dos projetos.

Aos professores do Setor de Parasitologia: Prof^o Kanan, pelo empréstimo de materiais e colaboração em muitos momentos. Ao Prof^o Carlos, Prof^a Neusa e Prof^a Márcia, pela convivência, amizade e incentivo.

À Silvia Pavan, pelo valioso auxílio técnico prestado em diversas fases e aspectos deste trabalho.

Aos inumeros colegas que passaram pelo Laboratório de Parasitologia em especial aos colegas do grupo da *Acanthamoeba*, que tornaram meus dias mais agradáveis.

Aos meus pais, Altair e Helena, sem os quais eu não teria chegado até aqui. Não lhes dedico meu trabalho, por que a eles dedico toda minha vida.

Ao meu Querido noivo, Marco Amaral, pelo seu amor, dedicação e incentivo.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro ao longo destes dois anos.

À todos o meu muito obrigada.

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Acanthamoeba* EM ÁGUA DE PISCINAS DA CIDADE DE PORTO ALEGRE, RS¹

Autor: Karin Silva Caumo

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marilise Brittes Rott

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Guedes Frazzon

RESUMO

Foram coletadas amostras de água de piscinas térmicas e não térmicas na cidade de Porto Alegre, RS, Brasil entre os meses de maio de 2006 e março de 2007, com o objetivo de determinar a presença do gênero *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 trofozoítos e na amplificação por PCR com oligonucleotídeos gênero-específico. O potencial patogênico foi avaliado usando testes de osmotolerância e termotolerância. Das 65 amostras analisadas, 13 (20%) foram positivas para amebas de vida livre e identificados morfologicamente como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*. Destas, 9 possuíam características compatíveis com o grupo morfológico II e 4 com o grupo III. Todos os isolados identificados morfologicamente quando submetidos à Reação de PCR, confirmaram pertencer ao gênero *Acanthamoeba* e 38% (5/13) dos isolados foram considerados potencialmente patogênicos a partir dos testes de osmotolerância e termotolerância. Neste estudo, o método molecular de RAPD (“Random Amplified Polymorphic-DNA”) foi utilizado para investigar a relação genética entre os 13 isolados de piscinas e dois isolados de referência da ATCC. De 10 oligonucleotídeos decaméricos testados, quatro foram selecionados por gerarem produtos de amplificação passíveis de análise. A similaridade entre os isolados foi calculada utilizando-se o coeficiente de Jaccard e o dendrograma construído pelo método da média das distâncias entre grupos (“Average Linkage”). Quatro grupos distintos (G1-G4) de isolados foram formados de acordo com a similaridade genética entre eles. Sugeriu-se que os isolados do G1 por agruparem-se aos isolados de referência de *A. castellanii* (ATCC 30010 e 50492) possam pertencer a esta espécie. Os dados fenotípicos, tais como, morfologia e testes de tolerância foram relacionados aos dados genotípicos de RAPD e permitiram a caracterização dos isolados. Os resultados deste primeiro estudo de isolamento e caracterização de *Acanthamoeba* de água de piscinas na cidade de Porto Alegre-RS, Brasil confirmam a presença de isolados potencialmente patogênicos que podem representar um risco à saúde humana.

Palavras-chave: *Acanthamoeba*, amebas de vida livre, piscinas, patogenicidade, RAPD.

¹Dissertação 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 (100 p.). Fevereiro, 2009.

CHARACTERIZATION OF *Acanthamoeba* ISOLATES IN SWIMMING POOLS WATER AT THE CITY OF PORTO ALEGRE, RS¹

Author: Karin Silva Caumo

Advisor: Prof^a. Dr^a. Marilise Brittes Rott

Co-advisor: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon

ABSTRACT

Water samples were collected from both heated and unheated swimming pools in the city of Porto Alegre, RS, Brazil between May 2006 and March 2007, to determine the presence of *Acanthamoeba* in the water of swimming pools 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 trophozoites and cysts morphology and on the amplification through PCR with genus-specific oligonucleotides. The potential pathogenic was assessed by osmotolerance and temperature tolerance assays. From the 65 samples analyzed, 13 (20%) were positive for free-living amoebae, and the isolates morphologically identified as belonging to the genus *Acanthamoeba*. Out of these, 9 presented characteristics compatible with morphological group II, and 4 with group III. All the morphologically identified isolates, when submitted to PCR, were confirmed as belonging to the genus *Acanthamoeba*, and 38% (5/13) of the isolates were considered potentially pathogenic according to osmotolerance and temperature tolerance assays. In this study, the molecular RAPD method (Random Amplified Polymorphic-DNA) was used to investigate the genetic relationship among 13 isolates from swimming pools and two strains from the ATCC reference. From the ten decameric oligonucleotides tested, four were selected for generating products of amplification possible to be analyzed. The similarity between isolates was calculated using the Jaccard coefficient and the dendrogram constructed by using the method of the average distances between groups ("Average Linkage"). Four distinct groups (G1-G4) of isolates were separated according to genetic similarity between them. It was suggested that the isolates from G1 once group up with the reference isolates of *A. castellanii* may belong to this species. The phenotypic data such as morphology and tolerance tests were related to RAPD genotypic data and led to the characterization of isolates. The results of this study about isolation and characterization of *Acanthamoeba* in swimming pools water at Porto Alegre, RS, Brazil confirm the presence of potentially pathogenic isolates which can present risks to human health.

Keywords: *Acanthamoeba*, free-living amoebae, swimming pools, pathogenicity, RAPD.

¹ 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. (100 p.). Fevereiro, 2009.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i>	13
Figura 2 – Classificação taxonômica de amebas de vida livre	15
Figura 3 - Ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i>	18
Figura 4 - Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> multinucleado obtido de cultivo em meio líquido e corado com tricrômico	19
Figura 5 - Morfologia do cisto de <i>Acanthamoeba</i> do grupo I.....	20
Figura 6 - Morfologia do cisto de <i>Acanthamoeba</i> do grupo II.....	21
Figura 7 - Morfologia do cisto de <i>Acanthamoeba</i> do grupo III	21
Figura 8 - Olho infectado por <i>Acanthamoeba</i> exibindo epitélio ulcerado, infiltração no estroma e opacidade na córnea, típicos de ceratite aguda	28
Figura 9 - Fatores de risco que contribuem para ceratite por <i>Acanthamoeba</i> spp.....	29
Figura 10 - Cistos e trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> em cultivo monoxênico	50
Figura 11 - Cistos e trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> em placa de ágar não-nutriente com crescimento de fungo filamentosos	50
Figura 12 - Cultivo em meio líquido (PYG) de AVL com a presença de bactérias	51
Figura 13 - Trofozoítos e cistos de <i>Acanthamoeba</i> em cultivo axênico	51
Figura 14 - Médias dos valores correspondentes aos parâmetros físico-químicos da água de piscinas térmicas e não-térmicas.....	53
Figura 15 - Trofozoíto característico do gênero <i>Acanthamoeba</i>	57
Figura 16 - Dupla parede dos Cistos de <i>Acanthamoeba</i>	57
Figura 17 - Cistos de <i>Acanthamoeba</i> do isolado PO1 corados com tricrômico	59
Figura 18 - Trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> do isolado PTI3 corados com tricrômico....	59
Figura 19 - Cistos e trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> do isolado PTO5 corados com tricrômico	59
Figura 20 - Cistos e trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> do isolado PTI5 corados com	

tricolor 59	59
Figura 21 - Trofozoítos e cisto de <i>Acanthamoeba</i> do isolado PTM6 corados com tricolor 59	59
Figura 22 - Cistos de <i>Acanthamoeba</i> do isolado PTM6 corados com tricolor 59	59
Figura 23 - Trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> do isolado P21 60	60
Figura 24 - Cisto de <i>Acanthamoeba</i> do isolado P21, grupo II 60	60
Figura 25 - Isolado de <i>Acanthamoeba</i> (PTI6), cistos do grupo II 60	60
Figura 26 - Isolado de <i>Acanthamoeba</i> (PTA2), cistos do grupo II 60	60
Figura 27 - Isolado de <i>Acanthamoeba</i> (PTI5), cistos do grupo II 60	60
Figura 28 - Isolado de <i>Acanthamoeba</i> (PTI2), cistos do grupo III 60	60
Figura 29 - Isolado de <i>Acanthamoeba</i> (PTI8), cistos do grupo III 60	60
Figura 30 - Análise molecular do gene 18S ssu rDNA 65	65
Figura 31 - Perfis de RAPD de 15 isolados de <i>Acanthamoeba</i> obtidos com o oligonucleotídeo iniciador OPC 05 67	67
Figura 32 - Perfis de RAPD de 15 isolados de <i>Acanthamoeba</i> obtidos com o oligonucleotídeo iniciador OPC 06 68	68
Figura 33 - Perfis de RAPD de 15 isolados de <i>Acanthamoeba</i> obtidos com o oligonucleotídeo iniciador OPC 09 68	68
Figura 34 - Perfis de RAPD de 15 isolados de <i>Acanthamoeba</i> obtidos com o oligonucleotídeo iniciador OPC 10 69	69
Figura 35 - Dendrograma obtido a partir dos valores de similaridade genética por RAPD utilizando o coeficiente de Jaccard e a análise de agrupamento pelo Método de Ligação Média entre isolados de piscinas do gênero <i>Acanthamoeba</i> e isolados de referência 69	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genótipos de <i>Acanthamoeba</i> e suas associações com doenças humanas (ceratites e encefalites).....	23
Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores empregados nas reações de amplificação de RAPD para a caracterização de <i>Acanthamoeba</i>	45
Tabela 3 - Relação de clubes visitados, número de piscinas, tipo de piscina, número de amostras positivas e isolados obtidos	49
Tabela 4 - Caracterização morfológica de isolados de AVL de água de piscinas	58
Tabela 5 - Diferenciação da patogenicidade de isolados de <i>Acanthamoeba</i> por testes de tolerância.....	63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 O gênero <i>Acanthamoeba</i>	13
2.2 Classificação taxonômica.....	14
2.3 Distribuição Ambiental.....	15
2.4 Morfologia e ciclo de vida	17
2.4.1 Classificação morfológica de <i>Acanthamoeba</i>	20
2.5 Outras classificações	22
2.6 RAPD - “Random Amplified Polymorphic DNA”: marcador molecular para a caracterização de <i>Acanthamoeba</i>	24
2.7 Infecções causadas por <i>Acanthamoeba</i>	26
2.7.1 Ceratite por <i>Acanthamoeba</i>	27
2.7.2 Encefalite Amebiana Granulomatosa (EGA).....	30
2.8 <i>Acanthamoeba</i> e bactérias endossimbiontes	31
2.9 Fatores de virulência que contribuem para infecções por <i>Acanthamoeba</i>	32
2.9.1 Marcadores de patogenicidade de <i>Acanthamoeba</i>	33
2.10 Presença de <i>Acanthamoeba</i> em piscinas.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Organismos e cultivo	36
3.1.1 Isolados de referência da ATCC	36
3.1.2 Isolados de água de piscinas	36
3.1.3 Cultivo dos isolados de <i>Acanthamoeba</i>	36
3.1.4 Isolado bacteriano	37
3.1.5 Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	37
3.2 Isolamento e identificação de Amebas de Vida Livre (AVL) a partir de água de piscinas	37
3.2.1 Coleta e concentração de amostras de água de piscinas.....	37
3.2.2 Isolamento de amebas de vida livre	38
3.2.3 Obtenção de culturas monoxênicas	38
3.2.4 Obtenção de culturas axênicas	39
3.2.5 Indução ao encistamento	39
3.2.6 Coloração de cistos e trofozoítos	40
3.3 Identificação morfológica de isolados do gênero <i>Acanthamoeba</i>	40
3.3.1 Exflagelação dos organismos.....	40

3.3.2	Análise morfológica	41
3.3.3	Tempo de contração dos vacúolos pulsáteis	41
3.4	Estudo da patogenicidade de isolados de <i>Acanthamoeba</i> por testes de tolerância	41
3.4.1	Teste de Osmotolerância	42
3.4.2	Teste de Termotolerância	42
3.5	Identificação molecular dos isolados de <i>Acanthamoeba</i>	43
3.5.1	Extração de DNA total de <i>Acanthamoeba</i>	43
3.5.2	Quantificação do DNA de <i>Acanthamoeba</i>	44
3.5.3	Confirmação do gênero <i>Acanthamoeba</i> por Reação em Cadeia da Polimerase	44
3.5.4	Amplificação do DNA de <i>Acanthamoeba</i> por RAPD.....	45
3.5.5	Análise dos fragmentos amplificados por PCR e RAPD	46
3.5.6	Cálculo das estimativas de distância genética entre os isolados.....	46
3.6	Análises dos dados.....	47
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	Isolamento de amebas de vida livre em água de piscinas	48
4.2	Avaliação dos parâmetros físico-químicos da água de piscinas	52
4.3	Identificação morfológica dos isolados de AVL	55
4.3.1	Teste de exflagelação	55
4.3.2	Identificação morfológica dos isolados de AVL do gênero <i>Acanthamoeba</i>	56
4.4	Estudo da patogenicidade de isolados de <i>Acanthamoeba</i> por testes de tolerância	62
4.5	Identificação molecular dos isolados de <i>Acanthamoeba</i>	65
4.5.1	Confirmação do gênero <i>Acanthamoeba</i> por Reação em Cadeia da Polimerase	65
4.5.2	Caracterização de isolados do gênero <i>Acanthamoeba</i> por RAPD	66
5.	CONCLUSÕES	76
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
7.	APÊNDICES	95
8.	ANEXOS	97

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, com o aumento do número de casos clínicos de ceratite por *Acanthamoeba* em diversos países, muitos pesquisadores têm apresentado interesse no estudo destes organismos, pois podem se mostrar patogênicos ao homem causando um impacto negativo na saúde de milhares de pessoas. *Acanthamoeba* é um protozoário de vida livre, ubiqüitária na natureza e muito encontrada em ambientes aquáticos antropogênicos. Apresenta forma de resistência em condições ambientais adversas, o que permite a sua sobrevivência a tratamentos físico-químicos da água para consumo humano e de uso recreacional. Estas amebas são organismos anfitriões, pois podem ser encontrados livres no ambiente ou como parasitos facultativos no homem, com o potencial para causar infecções envolvendo o cérebro, pele, pulmão e olhos. 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.

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. A determinação correta da taxonomia dentro do gênero, etapa inicial de análise de qualquer organismo posterior ao processo de isolamento, é um fator essencial para a realização de estudos relacionados à ecologia, patogenicidade e epidemiologia. O uso de técnicas de biologia molecular poderá ser utilizado para o refinamento da identificação morfológica clássica, dando mais confiabilidade aos resultados. Estudos moleculares têm sido realizados na busca de padrões genéticos nestes organismos que auxiliem na sua caracterização. Entre as técnicas baseadas em marcadores moleculares, o RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) é uma ferramenta muito útil, por ser uma forma rápida e fácil para avaliar a diversidade genética entre organismos, sem a necessidade de grandes quantidades de DNA.

Alguns trabalhos têm mostrado que isolados patogênicos de *Acanthamoeba* exibem crescimento à temperatura e osmolaridade aumentadas e estes determinantes fisiológicos

podem ser usados na diferenciação e prévia caracterização de isolados clínicos e ambientais. Um ponto bastante interessante a ser esclarecido e de grande interesse em saúde pública é se todas as amebas de vida livre (AVL) encontradas normalmente no ambiente são potencialmente patogênicas, ou se só alguns desses organismos seriam capazes de provocar infecções.

Levando em consideração que a piscina é um elemento relacionado à saúde da comunidade e que a água reservada nesses tanques, pode veicular amebas de vida livre potencialmente patogênicas, o objetivo do presente trabalho foi determinar a presença do gênero *Acanthamoeba* em água de piscinas da cidade de Porto Alegre - RS, Brasil, bem como avaliar o potencial patogênico dos isolados e determinar o perfil genotípico a partir da técnica de RAPD. A caracterização fenotípica e genotípica dos isolados de água de piscinas, 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 nas águas das piscinas poderão auxiliar na aplicação de medidas de controle.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Acanthamoeba*

As amebas de vida livre (AVL) são protozoários unicelulares com ampla distribuição ambiental. Podem ser encontradas no solo, ar atmosférico e ambientes aquáticos, tais como, água doce e salgada (RODRIGUEZ-ZAGORA, 1994; LIU *et al.*, 2006). *Acanthamoeba*, *Hartmannella* e *Naegleria* são as principais AVL potencialmente patogênicas para o homem e animais e estão relacionadas com meningoencefalites, ulcerações da pele e infecções da córnea (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004a). O gênero *Acanthamoeba* é um grupo de aproximadamente 25 espécies distribuídas mundialmente (BOOTON *et al.*, 2005). Isolados patogênicos do gênero têm ganho cada vez mais relevância médica principalmente como agentes causadores de ceratite amebiana, uma vez que, atingem indivíduos imunocompetentes (Figura 1).

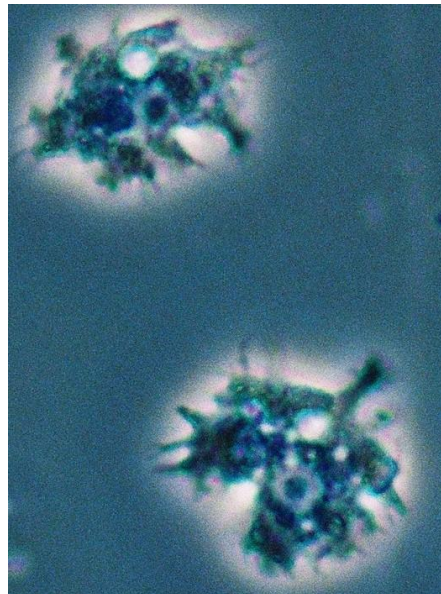


Figura 1 - Trofozoítos de *Acanthamoeba*
Fonte: Karin Caumo

A *Acanthamoeba* foi primeiramente isolada de poeira em 1913 por Puschkarew e chamada de *Amoeba polyphagus* (PAGE, 1967). Em 1931, Volkonsky criou a denominação de gênero *Acanthamoeba*. Em 1930, Castellani isolou uma ameba que estava contaminando uma placa de cultura de levedura, e foi subsequenteiramente chamada de *Acanthamoeba castellanii*. Page (1967) reescreveu *A. polyphagus* como *Acanthamoeba polyphaga*. O interesse médico e epidemiológico com relação as AVL começou quando Culbertson *et al.* (1958) durante a produção de vacinas para a poliomielite, observaram o desenvolvimento de placas de algum organismo contaminante da cultura celular. O fluido dessas placas quando inoculado em ratos e macacos levava-os à morte por encefalite, os contaminates destas culturas eram cistos e trofozoítos de amebas identificadas como pertencente ao gênero *Acanthamoeba*.

2.2 Classificação taxonômica

Com relação à taxonomia das AVL, as primeiras identificações eram baseadas em critérios morfológicos. Os trabalhos mais recentes incluem novos dados provenientes de estudos de seqüenciamentos genômicos dos genes 16S e 18S rDNA (DE JONCKHEERE, 2003; STOTHARD *et al.*, 1998). De acordo com o sistema de classificação taxonômico os gêneros *Acanthamoeba* e *Balamuthia* foram classificados como pertencentes à família Acanthamoebidae. *B. mandrillaris*, originalmente descrita como uma ameba da ordem Leptomyxida, foi incluída na família Acanthamoebidae (CORLISS, 1998) com base nos dados do seqüenciamento do gene 16S rDNA (ZETTLER *et al.*, 2000; BOOTON *et al.*, 2003) (Figura 2).

Atualmente a Sociedade Internacional de Protistologistas criou outro sistema de classificação. De acordo com este novo esquema, os eucariotos tem sido classificados em seis grupos, ou “super-grupos”, chamados de Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata e Excavata. *Acanthamoeba* e *Balamuthia* foram incluídas no grupo Amoebozoa: (Acanthamoebidae), *Hartmannella* também foi incluída no grupo

Amebozoa (Tubulinea: Tubulinida) enquanto, *N. fowleri* e *Vahlkampfia* no grupo Excavata (Heterolobosia: Vahlkampfiidae) (ADL *et al.* 2005; VISVESVARA & SCHUSTER, 2008a).

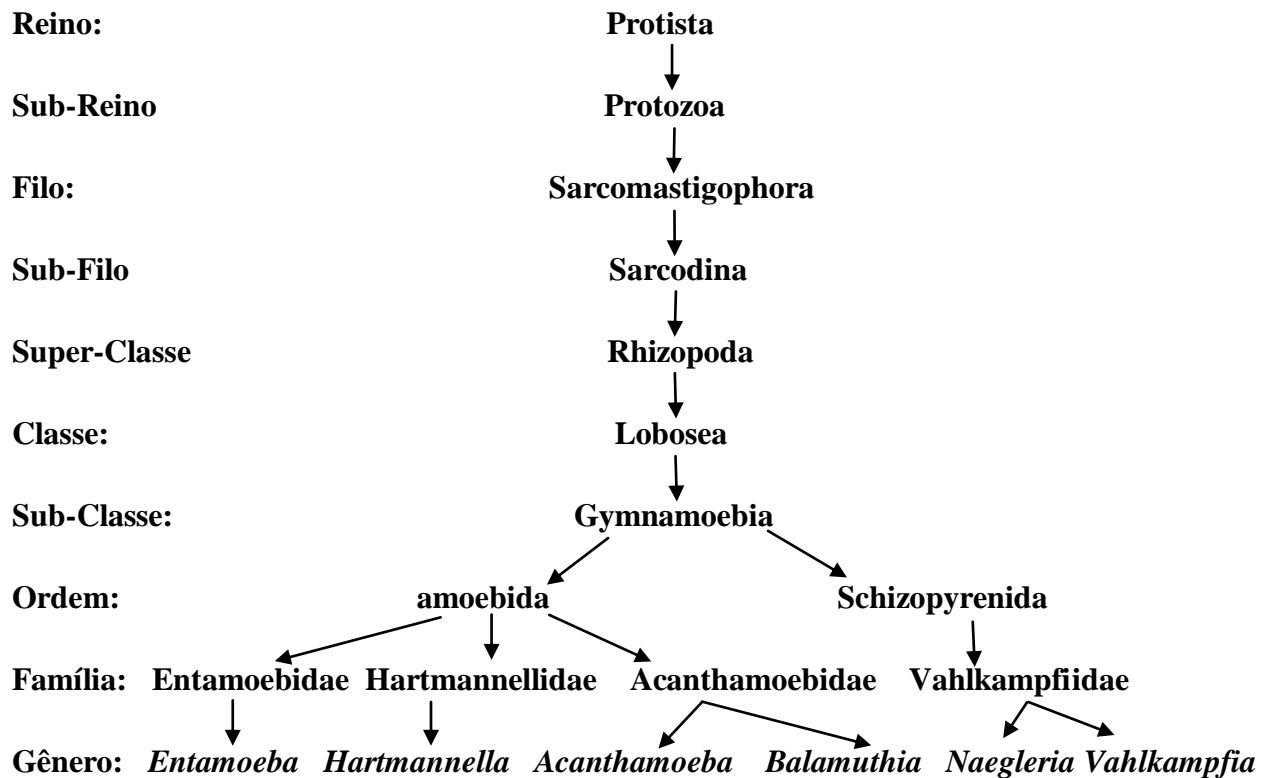


Figura 2 - Classificação taxonômica de amebas de vida livre

Fonte: Khan (2006, p. 565).

2.3 Distribuição ambiental

Acanthamoeba é o gênero mais comum dentre as amebas de vida livre, estima-se que possa ser também o protozoário de vida livre mais comum, o que confere ao gênero uma grande importância ecológica, uma vez que apresenta uma distribuição cosmopolita e tem sido isolada de uma grande variedade de habitats (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004a).

São isoladas de praticamente todos os ambientes como solo (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; BOOTON *et al.*, 2004; LORENZO-MORALES *et al.*, 2005a) água doce

de lagos e rios (ETTINGER *et al.*, 2003; LORENZO-MORALES *et al.*, 2005b; LORENZO-MORALES *et al.*, 2006), piscinas (TSVETKOVA *et al.*, 2004; GÓRNIK & KUZNAGRYGIEL, 2004; GIANINAZZI *et al.* 2009), sistemas de rede pública (BERNANDER & KALLING, 1998), nas águas aquecidas de sistema hospitalar (ROHR *et al.*, 1998), correntes subterrâneas, água mineral engarrafada e água marinha (LORENZO-MORALES *et al.*, 2005c). Também encontradas em soluções de limpeza contidas em estojos de lentes de contato (MARTINEZ & VISVESVARA, 1997; RADFORD *et al.*, 1998; SHARMA *et al.*, 2000; PARIJA *et al.*, 2001; PENS *et al.*, 2008). Ainda podem ser encontradas no ar (KINGSTON & WARHURST, 1969), nos sistemas umidificados, nos materiais cirúrgicos, nos cultivos celulares e mesmo em aparelhos de ar condicionado (FORONDA, 1996). No homem podem ser encontradas no nariz, na traquéia de pacientes com vias respiratórias afetadas, nas secreções bronquiais, no ouvido e no sistema nervoso central (BYRNE & BURD, 1995; KODET *et al.*, 1998).

Anticorpos anti-*Acanthamoeba* podem ser detectados no soro de humanos e animais, devido à ampla distribuição destes organismos na natureza e intenso contato com estas populações, sugerindo que as infecções podem ser comuns, porém auto-limitada em um hospedeiro competente (MA *et al.*, 1990; SELL *et al.*, 1997; ARMSTRONG, 2000; MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003). Segundo Chappell *et al.* (2001) mais de 80% da população de indivíduos aparentemente normais têm anticorpos anti-*Acanthamoeba*.

Algumas espécies de *Acanthamoeba* podem comportar-se como parasitos facultativos de seres humanos e animais domésticos existindo sob a forma de vida livre ou parasitária, sendo denominadas anfizóicas (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004a). Sua presença no homem é completamente acidental, sendo as patologias a elas associadas, raras e oportunistas. Quando se encontram na forma trofozoítica, se alimentam de bactérias, fungos, outros protozoários e algumas cianobactérias, atuando como fagótrofos nas superfícies aeróbias do solo e sedimentos (DE JONCKHEERE, 1991). Quando invadem o organismo e colonizam o hospedeiro, se nutrem dos seus tecidos (ARMSTRONG, 2000).

2.4 Morfologia e ciclo de vida

Os organismos do gênero *Acanthamoeba*, isolados pela primeira vez em 1930 por Castellani e inicialmente classificados como *Hartmannella*, são encontrados sob duas formas em seu ciclo de vida: o trofozoíto, que é a forma vegetativa da célula e o cisto, forma de resistência, que é formado quando as condições do meio não são favoráveis (Figura 3) (PAGE, 1988).

Os trofozoítos se alimentam de bactérias, algas, fungos, leveduras, matéria orgânica ou por inclusão de partículas líquidas. A divisão celular é assexuada ocorrendo por fissão binária e não possuem um estágio flagelar (PRESTON & KING, 1984). São células com tamanhos de 14 a 40 μm de diâmetro, variando significativamente entre isolados pertencentes a diferentes espécies/genótipos (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008a). O citoplasma do trofozoíto de *Acanthamoeba* é abundante e apresenta-se granuloso com movimentos polidirecionais através da emissão de pseudópodes globosos e hialinos, de onde surgem finos pseudópodes semelhantes a espinhos, chamados de acantopódios. Os acantopódios, estruturas características do gênero, são projeções aciculiformes da membrana celular importantes na adesão a superfícies (biológica ou inerte), movimentos celulares e captura de organismos (KHAN, 2006). Geralmente os trofozoítos são uninucleados com um grande nucléolo central, entretanto, células multinucleadas são comuns quando a *Acanthamoeba* é mantida em culturas líquidas (Figura 4) (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003). O citoplasma apresenta diversos vacúolos, possui um vacúolo contrátil proeminente, que desaparece temporariamente e reaparece em um movimento de sístole-diástole, responsável pelo controle osmótico da célula, além de vacúolos digestivos. São organismos aeróbicos, mas seus trofozoítos podem se adaptar em ambientes com pouco oxigênio, durante um curto período de tempo (LLOYD *et al.*, 1983; TURNER *et al.*, 2006).

O encistamento das amebas é uma forma de proteção contra fatores adversos como a dessecação, falta de nutrientes e uma variedade de agentes químicos (desinfetantes e antimicrobianos) e físicos (calor, frio, radiação ultravioleta) (AKSOZEK *et al.*, 2002). A viabilidade dos cistos de *Acanthamoeba* tanto no meio ambiente natural como em laboratório, armazenadas em água a 4°C, é de aproximadamente 25 anos, mantendo pelo menos quando

cultivados *in vitro*, sua capacidade invasiva por oito anos. Presume-se que no meio natural, a virulência se mantém passados estes 25 anos (MAZUR *et al.*, 1995). A patogenicidade de *Acanthamoeba* se vê diminuída em torno de 40% quando os cistos são submetidos a períodos de criopreservação superiores há cinco anos, enquanto *Naegleria fowleri* tem sua virulência aumentada durante os primeiros 30 meses de congelamento (JOHN & JOHN, 1996). Cistos de espécies de *Acanthamoeba* causadoras de ceratite têm sobrevivido em torno de 14 dias em soluções oftálmicas, incluindo desinfetantes usados para limpeza de lentes (BRANDT *et al.*, 1989).

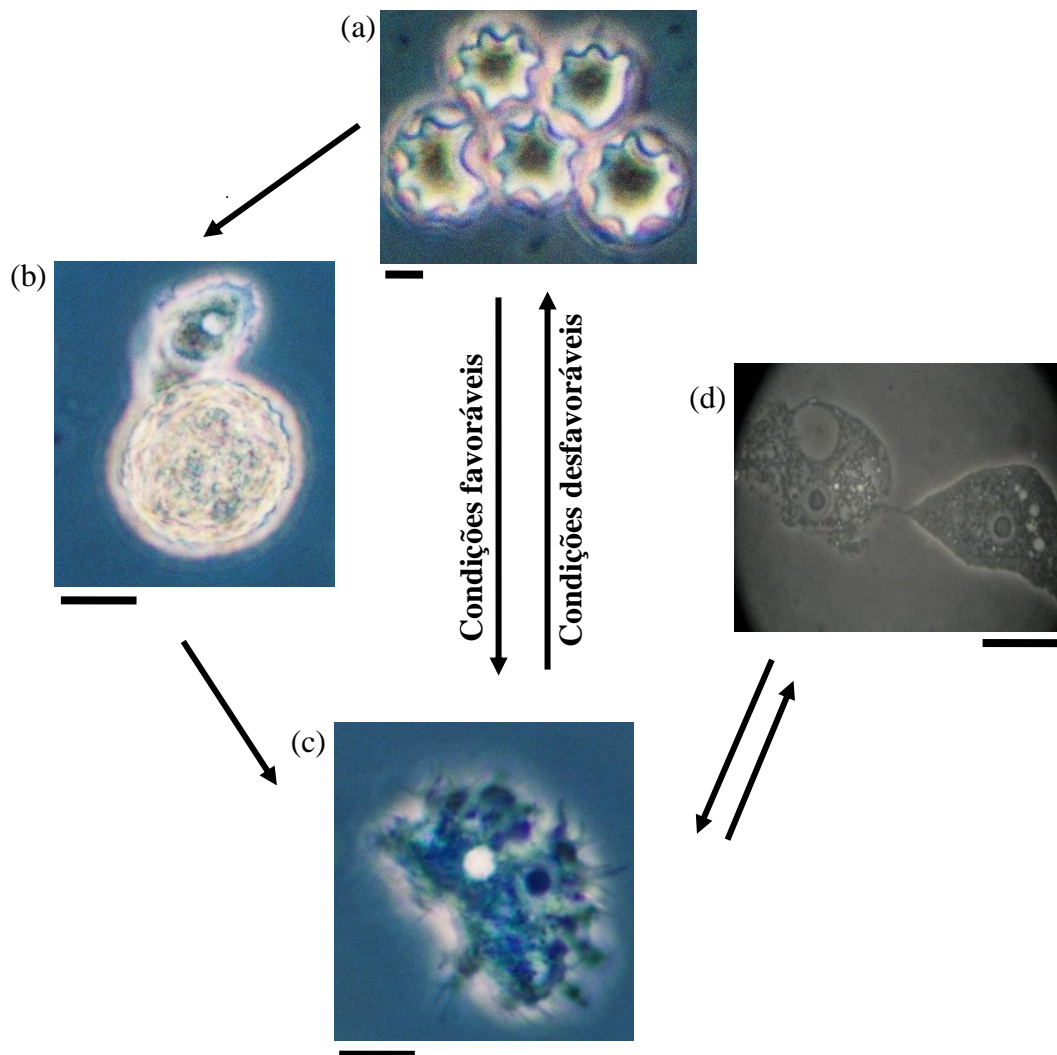


Figura 3 - Ciclo de vida de *Acanthamoeba*. (a) Cistos de *Acanthamoeba*, forma de resistência em condições desfavoráveis, caracterizados pela dupla parede. Barra = 5 µm; (b) Sob condições favoráveis o trofozoíto emerge do cisto. Barra = 6 µm; (c) Forma infectiva de *Acanthamoeba*, também conhecida como trofozoíto. Barra = 10 µm; (d) Reprodução assexuada por divisão binária. Barra = 10 µm

Fonte: Laboratório de Parasitologia - UFRGS

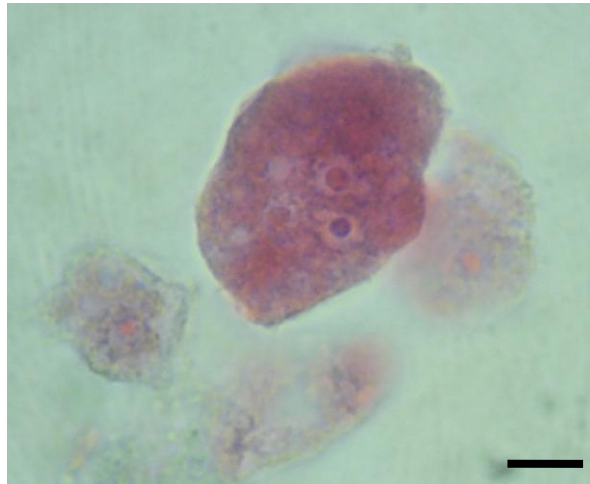


Figura 4 - Trofozoíto de *Acanthamoeba* multinucleado obtido de cultivo em meio líquido e corado com tricrômico. Microscópio óptico (1000X). Barra = 8 μ m

Fonte: Karin Caumo

O tamanho dos cistos do gênero *Acanthamoeba* pode variar de 10-20 μ m de diâmetro. São compostos por celulose (não presente no estágio de trofozoíto), que representa 10% do peso seco total do cisto e diversas proteínas. Possuem duas paredes: o endocisto e o ectocisto. De forma geral, o ectocisto é mais esférico, enquanto o endocisto apresenta diversas formas, que dependendo do isolado, podem variar de triangulares a estreladas. Os cistos apresentam um opérculo, local por onde a ameba sai ao desencistar assim que as condições ambientais se tornam favoráveis. Os dois envoltórios são separados entre si, mas se unem nos ostíolos, que são poros usados para monitorar as alterações ambientais. A distância entre as paredes do cisto e o número de pontos em que o endocisto se comunica com o ectocisto (braços do endocisto) também são variáveis (PAGE, 1988; GIAZZI, 1996; SCHUSTER & VISVESVARA, 2004a).

2.4.1 Classificação morfológica de *Acanthamoeba*

A diferenciação dos gêneros das AVL normalmente é feita através da morfologia dos cistos e trofozoítos, sendo relativamente simples a identificação do gênero *Acanthamoeba*. Entretanto, a taxonomia do gênero ainda é bastante indeterminada em nível de espécie.

Em 1977, Pussard & Pons propuseram a divisão do gênero *Acanthamoeba* em três grupos morfológicos com 18 espécies, baseados no tamanho e na forma dos cistos. Os grupos estão assim organizados:

Grupo I – As espécies deste grupo são caracterizadas por apresentarem cistos grandes (16 a 30 μm de diâmetro) quando comparados aos do grupo II e III (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008a). Os cistos se caracterizam pela forma estrelada da parede cística interna (endocisto) e a parede externa (ectocisto) é mais ou menos esférica (PUSSARD & PONS, 1977). Suas espécies não são consideradas patogênicas, porém já foi relatado por Fernandez e Crespo em 1992 um caso de infecção cerebral granulomatosa por *Acanthamoeba astronyxis* (Figura 5).

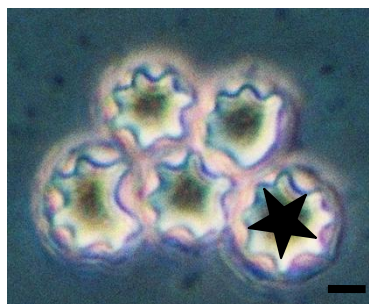


Figura 5 - Morfologia do cisto de *Acanthamoeba* do grupo I. Endocisto estrelado. Microscópio de contraste de fase (1000X). Barra= 6 μm

Fonte: Karin Caumo

Grupo II – Neste grupo encontram-se as espécies de *Acanthamoeba* mais amplamente e comumente isoladas, seus cistos possuem um tamanho médio com diâmetro de 18 μm ou menos, o endocisto pode apresentar-se de forma estrelada, oval, triangular ou quadrangular e o ectocisto segue mais ou menos o contorno do endocisto (KHAN, 2006) (Figura 6).

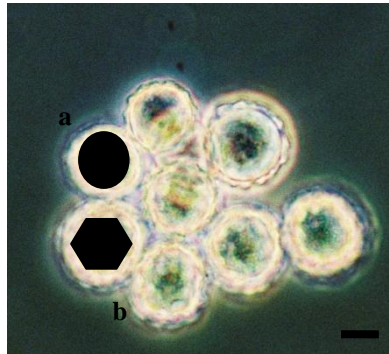


Figura 6 - Morfologia do cisto de *Acanthamoeba* do grupo II. Endocisto arredondado^a ou poligonal^b e ectocisto enrugado^c. Microscópio de contraste de fase (1000X). Barra = 4 μm
Fonte: Karin Caumo

Grupo III – Compreende as espécies cujos cistos medem aproximadamente 18 μm ou menos de diâmetro, com endocisto arredondado ou globoso, nunca estrelado. O ectocisto fino e liso ou fracamente franzido, justaposto ao endocisto é, às vezes, difícil de ser observado (KHAN, 2006; VISVESVARA & SCHUSTER, 2008a).

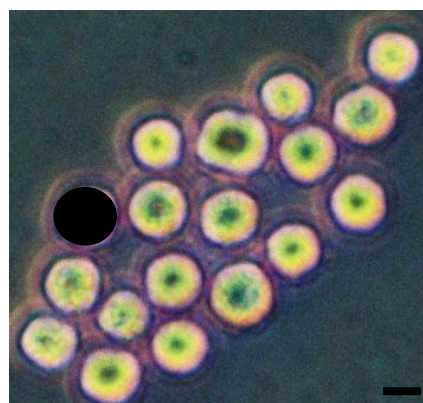


Figura 7 - Morfologia do cisto de *Acanthamoeba* do grupo III. Endocisto arredondado e ectocisto fino e liso. Microscópio de contraste de fase (1000X). Barra = 6 μm
Fonte: Karin Caumo

Subseqüentemente, a classificação de Pussard & Pons ganhou aceitação, e Page (1988) utilizando os critérios morfológicos sugeridos, juntamente com o comportamento dos trofozoítos em diferentes temperaturas e tipo de locomoção criou uma chave dicotômica para identificação das AVL. Ainda hoje, estes estudos são as principais referências para a identificação morfológica do gênero *Acanthamoeba* (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; WALOCHNIK *et al.*, 2000). Atualmente 25 espécies do gênero *Acanthamoeba* já foram identificadas (BOOTON *et al.* 2005).

2.5 Outras classificações

A identificação de espécies de *Acanthamoeba* empregando unicamente critérios morfológicos é muito subjetiva, uma vez que resultados obtidos em estudos taxonômicos apresentam variações importantes quando o uso de isoenzimas e biologia molecular são aplicados. As características morfológicas dos cistos são influenciadas pelas condições ambientais. Alguns trabalhos relatam que mesmo controlando as condições de cultivo e de encistamento, observa-se que diferentes espécies apresentam características similares em seus cistos e que em cultivos monoclonais aparecem cistos de diversas morfologias (VISVESVARA, 1991; KILVINGTON *et al.*, 1991). Mais recentemente, novos métodos têm sido propostos para a identificação de AVL, utilizados tanto para auxiliar o diagnóstico de infecções humanas, como também para identificação de AVL em amostras ambientais (KILVINGTON & BEECHING, 1995; LEHMANN *et al.*, 1998; MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003). Estes métodos, consistem em análises de DNA, RFLP (restriction fragment length polymorphism) e PCR da subunidade 18S de rDNA, padrões de restrição de DNA total, padrões de restrição de DNA mitocondrial, amplificação de seqüências específicas por PCR, RAPD (random amplified polymorphic-DNA), cariotipagem por eletroforese em campo pulsado (PFGE) entre outras. No gênero *Acanthamoeba*, em que várias espécies são encontradas, os estudos buscam o estabelecimento de relações filogenéticas entre elas (GAST *et al.*, 1996; STOTHARD *et al.*, 1998).

O critério mais promissor para a classificação de *Acanthamoeba* tem sido a utilização da seqüência do 18S rDNA. Através deste método, baseado na comparação da seqüência conservada deste gene, o gênero *Acanthamoeba* está dividido em 15 diferentes genótipos (T1 a T15), que estão relacionados com a virulência da ameba (GAST, 2001; SCHUSTER & VISVESVARA, 2004a) (Tabela 1). Cada genótipo exibe 5% ou mais de seqüências divergentes entre diferentes genótipos. Maghsood *et al.* (2005) propôs a subdivisão do genótipo T2 em dois grupos, T2a e T2b, devido a uma seqüência de dissimilaridade de 4,9% entre eles que está muito próximo do ponto de corte de 5% entre diferentes genótipos. Isto pode ajudar a diferenciar isolados patogênicos de não patogênicos dentro deste genótipo. Com a vantagem do uso das seqüências do gene 18S rDNA sobre a classificação baseada na morfologia, autores têm sugerido que cada tipo de seqüência poderia ser considerado como uma espécie separada (KHAN, 2006). A maioria das infecções humanas por *Acanthamoeba* têm sido associadas ao genótipo T4 com aproximadamente 90% dos casos de ceratite ligados a este genótipo (MAGHSOOD *et al.*, 2005).

Tabela 1 - Genótipos de *Acanthamoeba* e suas associações com doenças humanas (ceratites e encefalites)

Genótipos	Doenças
T1	Encefalites
T2a	Ceratites
T2b- ccap 1501/3c-a-like sequence	NA
T3	Ceratites
T4	Encefalites e Ceratites
T5	NA
T6	Ceratites
T7	NA
T8	NA
T9	NA
T10	Encefalites
T11	Ceratites
T12	Encefalites
T13	NA
T14	NA
T15	NA

NA - ainda não foi associado com nenhuma doença.

Fonte: Khan (2006, p. 570).

Outros estudos têm sido realizados para a discriminação de isolados de *Acanthamoeba*, uma vez que, o DNA ribossomal, em particular o gene 18S rRNA, é muito útil para a classificação de espécies e estudos filogenéticos, mas devido à pressão seletiva combinada à evolução, genes rRNA são altamente conservados, limitando o poder discriminatório de organismos proximamente relacionados (ADAM *et al.*, 2000). Autores têm proposto o estudo de outras regiões, tais como, o primeiro espaçador interno transcrito (ITS1), localizado entre o gene 18S rRNA e o 5,8S rRNA que contém uma variabilidade suficiente para a tipificação molecular constituindo-se em um instrumento apropriado para a diferenciação de espécies que são morfologicamente indistinguíveis e de organismos proximamente relacionados (BALDWIN *et al.* 1995; CASEY *et al.*, 2003). Schönian *et al.* (2001) relatou que análises por enzimas de restrição da região ITS1 de espécies de *Leishmania* claramente identificam todas as espécies de relevância médica, fornecendo evidências de que a região ITS1 pode conter informações sobre virulência.

Estes estudos podem ajudar no desenvolvimento de métodos mais precisos para a classificação taxonômica de *Acanthamoeba* e também no esclarecimento do papel destes organismos no ecossistema, interação com bactérias, bem como na causa primária e secundária de infecções humanas, contribuindo para um diagnóstico preciso desse grupo de patógenos, o que terá grande importância tanto do ponto de vista clínico como epidemiológico.

2.6 RAPD - “Random Amplified Polymorphic DNA”: marcador molecular para a caracterização de *Acanthamoeba*

O RAPD foi proposto inicialmente por Welsh & McClelland e Williams *et al.* em 1990. É um método multi-loci muito útil na caracterização molecular de organismos e se baseia na amplificação de seqüências polimórficas de DNA, utilizando para tanto uma variante de PCR onde somente um oligonucleotídeo pequeno (cerca de 10 pb) é utilizado e com baixa temperatura de associação. Este é um método simples, que não necessita do conhecimento prévio de seqüências de DNA e permite analisar uma grande quantidade de

locus simultaneamente, onde os polimorfismos existentes entre os isolados e as espécies analisadas são detectados, mediante uma eletroforese, com diferenças entre os padrões de fragmentos de DNA amplificados (WELSH & MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1990).

O polimorfismo em nível de DNA se caracteriza pela presença ou ausência de um determinado segmento amplificado de um oligonucleotídeo iniciador ou por padrões diversos obtidos por amplificação com vários oligonucleotídeos iniciadores, sempre baseado na composição de duas ou mais amostras (ANDERSON & FAIRBANKS, 1990). Com esta técnica é possível escanear o genoma inteiro para obter um conjunto de marcadores polimórficos de DNA. Como estes iniciadores apresentam seqüências nucleotídicas arbitrárias, o RAPD não requer, para o desenho destes, nenhuma informação sobre a seqüência do DNA a ser amplificada.

As principais vantagens do RAPD, com relação a outras técnicas são a sua facilidade, rapidez, a utilização de quantidades mínimas de DNA e principalmente a grande quantidade de polimorfismo gerado por um único marcador. Os resultados da aplicação dessa técnica são padrões de bandas, semelhantes àqueles obtidos por RFLP. Assim como o método de RFLP, o RAPD indiretamente indica diferenças em seqüências, uma vez que mudanças nessas seqüências podem criar novos pontos de associação para o oligonucleotídeo, assim como alterar outros anteriormente existentes, conseqüentemente mudando o padrão de bandas apresentado. Dentro das aplicações da técnica de RAPD, se encontram a realização de mapas genéticos, o diagnóstico molecular, a taxonomia molecular, epidemiologia, diferenciação de isolados, entre outras (MYERS *et al.*, 1993; SAULNIER *et al.*, 1993). Em relação aos agentes parasitos, se tem demonstrado que esta técnica é capaz de discriminar entre gêneros e espécies de diferentes protozoários parasitos (NOYES *et al.*, 1996; ALONSO, 1999; ORTEGA-RIVAS *et al.*, 2003).

O RAPD apresenta baixa reprodutibilidade entre laboratórios e até mesmo dentro do mesmo laboratório. Os produtos resultantes da amplificação vão depender de muitos fatores como, por exemplo, o tamanho da seqüência do iniciador, as condições de reação, o termociclador empregado, entre outros. Sendo assim, a técnica requer cuidados no preparo de soluções estoques e componentes da reação, na manipulação de micropipetas, reagentes e enzimas, e na programação de termocicladores. Portanto em virtude da técnica de RAPD ser

sensível a pequenas modificações é recomendado a otimização cuidadosa das condições experimentais para que os resultados sejam mais confiáveis e reprodutíveis (CAIXETA *et al.*, 2006).

Apesar da utilidade desses padrões como indicadores da variabilidade genética, ainda há limitações inerentes à análise de dados de RAPD devido à falta de certeza de que as bandas são homólogas não sendo possível fazer análises filogenéticas. Como não se tem indicação da natureza dessas seqüências que podem ser tanto de regiões de grande importância biológica (reguladoras, estruturais, codificadoras de proteínas), quanto a regiões cuja seqüencia não tem função, é difícil estabelecer a significância dos diferentes níveis de similaridade entre os isolados. Por isso, o RAPD se torna mais útil em análises genéticas iniciais de espécies não caracterizadas e não como uma ferramenta conclusiva. O caminho mais plausível a ser seguido na caracterização de isolados por RAPD, parece ser a somatória dos enfoques morfológicos com o refinamento das análises através de outros métodos moleculares (SINGH, 1997). Ou seja, com o aumento da utilização de diversas ferramentas ligadas à biologia molecular, com o conhecimento progressivo do genoma dos parasitos e com a utilização da técnica adequada para cada situação, pode-se somar esse novo conhecimento ao montante de informações já disponíveis, e assim refinar a classificação morfológica clássica (HUYSE & VOLCKAERT, 2002).

2.7 Infecções causadas por *Acanthamoeba*

Devido à ampla distribuição de *Acanthamoeba* na natureza, o contato humano com estes organismos é freqüente e inevitável. As patologias que a *Acanthamoeba* pode chegar a causar no homem estão intimamente relacionadas com a via de transmissão e, sobretudo, com o estado imunológico do paciente. As infecções sistêmicas e as que afetam o sistema nervoso central atingem pacientes que apresentam uma imunodepressão geral, enquanto as infecções corneanas são favorecidas por uma imunossupressão local (ARMSTRONG, 2000).

Embora já tenham sido encontrados como oportunistas em infecções em uma grande variedade de locais, como, pele, ouvido, pulmões, fígado, pâncreas, baço, próstata, tireóide,

trato urogenital, etc., causando sinusite, pneumonite, dermatite, entre outras, os organismos do gênero *Acanthamoeba* são responsabilizados principalmente por dois tipos de patologia em humanos: ceratite por *Acanthamoeba* e encefalite amebiana granulomatosa. Infecções na pele, pulmões e cérebro estão relacionadas a pacientes imunodeficientes ou imunodeprimidos incluindo pacientes com AIDS e mulheres grávidas, respectivamente (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003). A ceratite como resultado de infecção da córnea tem sido associada com contaminação da água e usuários de lentes de contato, atingindo imunocompetentes (GIANINAZZI *et al.*, 2009).

2.7.1 Ceratite por *Acanthamoeba*

A ceratite por *Acanthamoeba* é uma infecção invasiva da córnea, que se caracteriza pela perda gradual da visão, chegando, em alguns casos, a provocar cegueira (RADFORD *et al.*, 1998). As lesões oculares ocorrem, provavelmente, a partir de um microtraumatismo do olho. A contaminação do olho pelas amebas pode ocorrer a partir da água contaminada ou de partículas do ar ou do solo que contenham amebas. Recentemente tem sido descritos muitos casos de ceratite por *Acanthamoeba* entre usuários de lentes de contato, principalmente, entre aqueles que fizeram uso de solução salina caseira para limpeza e conservação das lentes, ou que nadaram usando lentes (OBEID *et al.*, 2003). Quando o trofozoíto entra em contato com a córnea, o próximo passo para o estabelecimento da infecção é a aderência e penetração no epitélio. As espécies de *Acanthamoeba* patogênicas aderem-se através de uma adesina às glicoproteínas manosiladas expostas em alguma lesão do epitélio córneo. O contato com a manose induz o trofozoíto a produzir proteases (serino-protease, cisteino-protease, elastase e metaloproteases) responsáveis pelas lesões características da infecção (HE, *et al.*, 1990; MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; HUSTON, 2004). A presença de um infiltrado em anel no estroma corneano é um sinal sugestivo de ceratite por *Acanthamoeba* e uma ceratoneurite radial é considerada como patognomônico dessa infecção (Figura 8) (WALOCHNIK *et al.*, 2000; OBEID *et al.*, 2003; RUTHES *et al.*, 2004).

Os principais sintomas de uma 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 & STHER-GREEN, 1990; FERNANDEZ & CRESPO, 1992; OBEID *et al.*, 2003; RUTHES *et al.*, 2004). A infecção é de difícil diagnóstico e tratamento. Falhas no controle da infecção podem levar a permanente perda da visão.

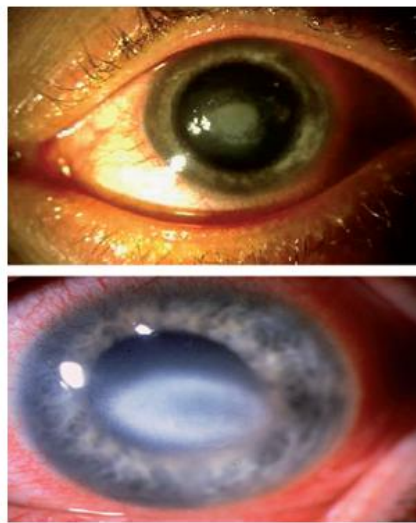


Figura 8 - Olho infectado por *Acanthamoeba* exibindo epitélio ulcerado, infiltração no estroma e opacidade na córnea, típicos de ceratite aguda.

Fonte: Khan (2006, p. 569)

A ceratite em humanos foi descrita em 1973, na Inglaterra, seguida por publicação nos Estados Unidos (NAGINGTON *et al.*, 1974; JONES *et al.*, 1975). No Brasil, os primeiros casos foram descritos em 1988 (NOSÉ *et al.*, 1988). Relatos de casos de ceratite por *Acanthamoeba* vêm aumentando significativamente nos últimos anos, paralelamente à popularização do uso de lentes de contato, principalmente hidrofílicas. Inicialmente a ocorrência da doença estava relacionada com traumatismos oculares, principalmente em áreas rurais. Estudos atuais demonstram que mais de 90% dos casos ocorrem em usuários de lentes de contato. Os fatores que predis põem à ceratite nos usuários de lentes de contato são o uso de

soluções não estéreis, banho de piscina usando lentes de contato e desinfecção inadequada das lentes após o uso (RADFORD *et al.*,2002). Apesar disso, 10 a 15% de casos de ceratite por *Acanthamoeba* ocorrem em pessoas que não usaram lentes de contato (ILLINWORTH & COOK, 1998). A figura 9 demonstra os fatores de risco que contribuem para a ceratite por *Acanthamoeba*: (a) nadar, especialmente usando lentes de contato; (b) lavar os olhos com água de torneira usando lentes de contato; (c) trabalhar com o solo sem proteção ocular; (d) exercer atividades relacionadas à água (como piscinas ou praias); (e) manipular lentes de contato com as mãos sujas; (f) usar solução salina caseira para a limpeza e conservação das lentes de contato.

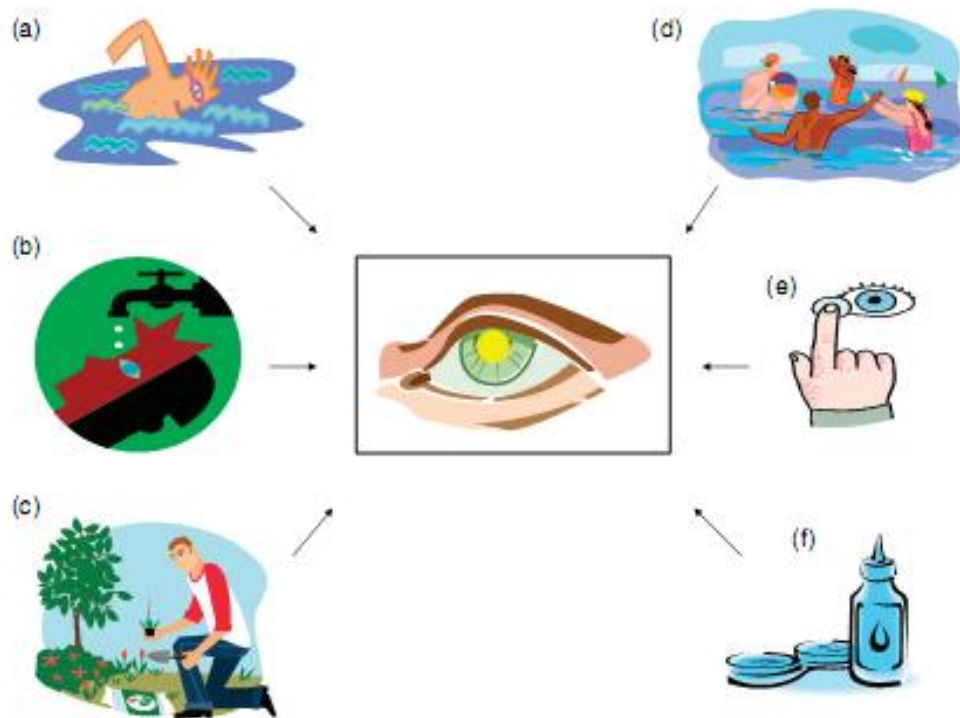


Figura 9 - Fatores de risco que contribuem para ceratite por *Acanthamoeba* spp.
Fonte: Khan (2006, p. 574)

Sete espécies têm sido mais frequentemente associadas a infecções oculares: *Acanthamoeba castellanii* (T4), *A. lugdunensis* (T4), *A. polyphaga* (T4), *A. rhyodes* (T4), *A. culbertsoni* (T3), *A. hatchetti* (T11) *A. griffini* (T3) (YU *et al.*, 2004). Mais de uma espécie foi descrita em até 20% das infecções (ILLINGWORTH & COOK, 1998). Aparentemente não há

diferença na manifestação clínica entre diversas espécies de *Acanthamoeba* quando causando ceratite. Apenas alguns isolados apresentam potencial patogênico e alguns marcadores podem ser utilizados para diferenciar isolados patogênicos de não patogênicos, tais como, a atividade proteolítica, termotolerância, osmotolerância e efeito citopático (KHAN, 2006).

Apesar da ampla variabilidade de genótipos, apenas os isolados dos genótipos T2, T3, T4, T6 e T11 têm sido associados com ceratite (WALOCHNIK *et al.*, 2000; DE JONCKEERE, 2003). O genótipo T4 apresenta a dominância de 90% nos casos de ceratite causadas por *Acanthamoeba*.

O número de casos de ceratite amebiana provocada por *Acanthamoeba* diagnosticados, aumentou dramaticamente durante os últimos vinte anos, calcula-se que mais de 3.000 casos aconteceram nos Estados Unidos (QVARNSTROM *et al.*, 2006). A incidência anual de ceratite por *Acanthameba* foi estimada em 1,36 por milhão nos EUA (VISVESVARA & STHERR-GREEN, 1990) em 3,06 por milhão na Holanda e em 1,2 por milhão no país de Gales. Na Inglaterra a incidência é de 0,2 a 1 indivíduo para cada 10.000 usuários de lentes de contato por ano (RADFORT *et al.*, 2002). Uma investigação de 22 centros de oftalmologia nos Estados Unidos, em fevereiro de 2007, conduzida pelo CDC (“Centers for Disease Control and Prevention”) revelou um aumento nacional do número de casos de ceratite por *Acanthamoeba* entre 2004 e 2006. Este aumento foi associado com o uso da solução para lentes de contato “Advanced Medical Optics Complete MoisturePlus” contaminada (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008a).

2.7.2 Encefalite amebiana granulomatosa (EAG)

EAG é considerada uma infecção oportunista, pois quase todos os casos relatados até o momento se referem a indivíduos imunologicamente debilitados especialmente aqueles que já sofreram algum tipo de terapia ou situação imunossupressora como alcoolismo, gravidez, quimioterapia, ou uso de antibióticos de amplo espectro e pacientes com AIDS (FERRANTE, 1991; VISVESVARA, 1991; TURNER *et al.*, 2000). Os mecanismos associados com a patologia não estão muito claros, mas as complicações patofisiológicas envolvem o sistema

nervoso central, onde há a indução de uma resposta pró-inflamatória, a partir da invasão pela barreira hematoencefálica e a ligação ao tecido, seguida de lesão neuronal (KHAN, 2003; SCHUSTER & VISVESVARA, 2004a; KHAN, 2006).

A invasão pode ocorrer pela pele (ulcerações) ou pelo trato respiratório (neuroepitélio), seguindo então por via sangüínea até o sistema nervoso central (MARTINEZ & VISVESVARA, 1997). O período de incubação pode variar de semanas a meses. Após esse período, vários sintomas aparecem: dor de cabeça acompanhada de febre, náuseas, vômitos, letargia, mudança da personalidade e demência (MARCIANO-CABRAL *et al.*, 2000). Como o desenvolvimento da doença é fulminante, geralmente o diagnóstico só é obtido após a necropsia, por análise do fluido cérebro-espinhal ou do próprio tecido cerebral, através da análise microscópica das formas trofozoíticas, porém, a constatação de altos níveis de anticorpos *Acanthamoeba*-específicos pode ajudar na confirmação da suspeita da infecção. Além dessas análises, métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) estão sendo desenvolvidos para o diagnóstico de EAG por *Acanthamoeba*, a fim de aumentar a chance de cura (KHAN, 2003; SCHUSTER & VISVESVARA, 2004a).

2.8 *Acanthamoeba* e bactérias endossimbiontes

A complexa ecologia da *Acanthamoeba* e seu papel na dispersão de microrganismos patogênicos em sistemas de água têm gerado a realização de vários estudos, devido à habilidade destas amebas atuarem como hospedeiro de bactérias patogênicas, tais como: *Legionella* spp., *Mycobacterium avium*, *Listeria monocytogenes*, *Burkholderia pseudomallei*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* sorotipo O 157, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori* e *Afipia felis* (GREUB & RAOULT, 2004). As amebas como importantes predadores no controle das comunidades microbianas, acabam tornando-se reservatórios ambientais de patógenos, comportando-se como “cavalo de Tróia” do mundo microbiano (BARKER & BROWN, 1994). Aproximadamente 20 a 24% dos isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba* carregam bactérias e patógenos intracelulares obrigatórios como *Chlamydia* e *Legionella* (GREUB & RAOULT, 2004; SCHMITZ-ESSER *et al.*, 2008).

Amebas presentes em fontes de água podem sobreviver a vários processos de purificação como o uso de biocidas e desinfetantes como cloro e ozônio (ROHR *et al.*, 1998; AKSOZEK *et al.*, 2002; THOMAS *et al.*, 2006) e quando infectadas por bactérias resistentes a amebas (BRA), assim denominadas por resistirem ao processo de digestão quando fagocitadas por elas, acabam por aumentar a resistência das bactérias, pois impedem que os produtos utilizados para a desinfecção atinjam estes microrganismos, propiciando a dispersão e permanência de bactérias patogênicas no ambiente (CIRILLO *et al.*, 1994). A microbiota bacteriana externa é importante para o desenvolvimento da *Acanthamoeba*, já que aumenta sua taxa de crescimento e sua capacidade de colonização, além disso, assegura sua sobrevivência em meios líquidos (CENGIZ *et al.*, 2000).

Vários endossimbiontes de *Acanthamoeba* são também parasitos de macrófagos humanos (por exemplo, *Legionella*) e sua habilidade de sobreviver na ameba, pode ser uma fase pré-adaptativa para infectar células humanas (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008a). A associação ameba-bactéria poderá provocar a perda da susceptibilidade a certos antibióticos, como ocorre no caso de *L. pneumophila* e *Micobacterium avium* quando infectam espécies de *Acanthamoeba*. O mecanismo pelo qual adquirem este tipo de resistência é desconhecido e não há evidências que estes fenótipos possam manter-se fora da ameba (BARKER & BROWN, 1994).

2.9 Fatores de virulência que contribuem para infecções por *Acanthamoeba*

A capacidade de *Acanthamoeba* produzir doenças em humanos é um processo multifatorial relacionado a fatores de virulência considerados diretos e indiretos.

Os fatores de virulência diretos são descritos separadamente como mecanismos contato-dependente e contato-independente. Os mecanismos contato-dependente estão relacionados à habilidade da ameba se ligar a células hospedeiras, etapa crucial na patogênese de infecções por *Acanthamoeba*. Esta etapa conduz a efeitos secundários, tais como, interferência com rotas de sinalização intracelular do hospedeiro, secreções de toxinas e a fagocitose das células hospedeiras, finalmente levando à morte celular (KHAN, 2006). Já os

mecanismos contato-independente estão relacionados à produção de dois tipos de enzimas hidrolíticas: proteases, que hidrolisam pontes peptídicas e fosfolipases que hidrolisam fosfolipídios (CAO *et al.*, 1998; KHAN *et al.*, 2000).

A habilidade da *Acanthamoeba* de sobreviver em um hospedeiro e sob condições ambientais adversas pode ser considerada um fator contribuinte para causar doenças e são chamados de fatores indiretos de virulência (KHAN, 2006). Dentre os fatores indiretos de virulência podemos citar: alteração fenotípica – cisto x trofozoíto, morfologia – presença de acantopódios no trofozoíto, resistência a drogas, ubiquidade, associação a biofilmes, fatores relacionados ao hospedeiro e tolerância fisiológica (crescimento em diferentes pH, tolerância à temperatura e osmotolerância) (GRAY *et al.*, 1995; TURNER *et al.*, 2000; KHAN *et al.*, 2001, 2002; DUDLEY *et al.*, 2005; GARATE *et al.*, 2006).

2.9.1 Marcadores de patogenicidade de *Acanthamoeba*

O crescimento a 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). Estes determinantes fisiológicos podem ser usados na diferenciação e prévia caracterização de isolados clínicos e ambientais correlacionados a testes de efeito citopático (KHAN *et al.* 2001).

Estes marcadores são características genotípicas de algumas AVL que podem se expressar em um hospedeiro, conferindo a elas a capacidade de melhor adaptação e viabilidade (ODOM *et al.*, 1997; SCHUSTER & VISVESVARA, 2004b). O mecanismo pelo qual a *Acanthamoeba* patogênica adapta-se a altas temperaturas e osmolaridade mantendo sua atividade metabólica ainda é desconhecido (KHAN, 2006).

2.10 Presença de *Acanthamoeba* em piscinas

Cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* têm sido detectados em fontes de água no mundo todo (RADFORD *et al.*, 1998; BOOTON *et al.*, 2002; ETTINGER *et al.*, 2003; SEAL *et al.*, 2003; KILVINGTON *et al.*, 2004; LORENZO-MORALES *et al.*, 2005c). A presença destas amebas na superfície da água representa um risco para a saúde humana, uma vez que, o contato com estes organismos é a principal via de contágio (VESALUOMA *et al.*, 1995). O uso recreacional de água de piscinas é claramente importante para a exposição de humanos a *Acanthamoeba* e conseqüentemente para o desenvolvimento de ceratite amebiana.

A presença de isolados de *Acanthamoeba* potencialmente patogênicos em piscinas tem sido documentada em vários estudos (DE JONCKHEERE, 1979a, 1979b; RIVERA *et al.*, 1993; TSVETKOVA *et al.*, 2004; GÓRNIK & KUŹNA-GRYGIEL, 2004; GIANINAZZI *et al.*, 2009). Na Polônia, estudos demonstraram a presença de AVL do gênero *Acanthamoeba* em amostras de água coletadas de piscinas internas e externas na cidade de Szczecin (GÓRNIK & KUŹNA-GRYGIEL, 2004). Do mesmo modo, na Finlândia, amostras de água de piscinas foram positivas para o gênero *Acanthamoeba* (VESALUOMA *et al.*, 1995). Ainda na Europa foram detectadas amebas potencialmente patogênicas na água de piscinas da Suíça (GIANINAZZI *et al.*, 2009). Em estudo realizado no Chile, vários gêneros de AVL foram isolados da água de piscinas públicas, dentre eles o gênero *Acanthamoeba* (MUÑOZ *et al.*, 2003)

No Brasil, existem alguns trabalhos que relatam a presença de *Acanthamoeba* em águas de uso recreacional, porém poucos trabalhos realizaram a caracterização dos isolados quanto a aspectos de patogenicidade, variabilidade genética, especificidade, entre outras características necessárias para um melhor entendimento do papel destes organismos na água de piscinas. 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 *et al.* (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). Alves (2006) isolou AVL a partir de água de piscinas do Distrito Federal,

entre os isolados observou-se a presença do gênero *Acanthamoeba* também observada em quase 100% dos isolados obtidos por Falchi (2006) em amostras de água de diferentes pontos da Laguna dos Patos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Organismos e cultivo

3.1.1 Isolados de referência da ATCC (“American Type Culture Collection”)

Os isolados empregados como controles neste trabalho foram: *Acanthamoeba castellanii* Neff (ATCC 30010) e *Acanthamoeba castellanii* T4 (ATCC 50492).

3.1.2 Isolados de água de piscinas

Isolados de *Acanthamoeba* obtidos de água de piscinas de clubes recreativos da cidade de Porto Alegre - RS foram isolados e identificados conforme descrito nos itens 3.2 e 3.3.

3.1.3 Cultivo dos isolados de *Acanthamoeba*

Os organismos foram rotineiramente mantidos em culturas monoxênicas (Item 3.2.3) e também em culturas axênicas em meio líquido contendo proteose peptona 2 %, extrato de levedura 0,2 % e glicose 1,8 % (PYG) (ANEXO A), suplementado com penicilina G potássica (400 UI/mL) e estreptomicina (400 µL/mL) e incubados a 30 °C. Subcultivos foram realizados a cada duas semanas.

3.1.4 Isolado bacteriano

Foi utilizado um isolado de referência de *Escherichia coli* (ATCC 25922) não patogênico para a realização de culturas monoxênicas.

3.1.5 Cultivo de *Escherichia coli*

Os cultivos de *E. coli* foram realizados em meio ágar triptona de soja (TSA) e incubados a 37 °C por 18 h. Para o preparo da suspensão bacteriana, 1 mL de solução salina de Page (ANEXO A) foi adicionada à superfície do meio de cultura com colônias de *E.coli* que foram gentilmente raspadas com alça de platina. A suspensão bacteriana foi removida para um novo tubo e submetida à temperatura de 56 °C por 2 h para inativação.

3.2 Isolamento e identificação de Amebas de Vida Livre (AVL) a partir de água de piscinas

3.2.1 Coleta e concentração de amostras de água de piscinas

Um total de 65 amostras de água de piscinas foi coletado entre os meses de maio de 2006 e março de 2007 de 22 clubes recreativos da cidade de Porto Alegre, RS. As coletas das amostras foram realizadas sob autorização da diretoria dos clubes através de um Ofício de autorização (ANEXO B). No estudo foram incluídas piscinas térmicas e não térmicas tratadas com cloro e seus compostos. Foram coletados três frascos de água com volume de 100 mL de cada piscina analisada, sendo que cada frasco foi considerado como uma amostra. A água foi obtida da superfície das piscinas e parâmetros físicos e químicos da água, tais como

temperatura, pH e cloro residual livre foram levados em consideração no momento da coleta. O pH e o cloro foram aferidos no momento da coleta por método colorimétrico. As amostras foram acondicionadas em isopor com gelo para o transporte e levadas ao laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) para processamento e análise imediatamente após as coletas.

Para a concentração de amebas de vida livre, primeiramente as amostras de água foram filtradas com gaze estéril dobrada, para remover folhas e sujidades. Após, foram centrifugadas a $250 \times g / 10 \text{ min}$, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso em aproximadamente 0,5 mL de solução salina de Page (RIVERA *et al.*, 1993; DE CARLI, 2001).

3.2.2 Isolamento de amebas de vida livre

O sedimento obtido foi transferido para placas de ágar não-nutriente (ANN) 1,5 % (ANEXO A) cobertas com uma suspensão de *Escherichia coli* (ATCC 25922) inativada pelo calor a $56 \text{ }^\circ\text{C}/2 \text{ h}$. As placas foram seladas com filme plástico (Parafilm®) e incubadas a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por até 15 dias. Para cada amostra de água, três placas foram preparadas. O exame das placas foi realizado diariamente durante o período de incubação em microscópio óptico (aumento de 100X) para observar a presença de amebas de vida livre (trofozoítos e/ou cistos). As placas negativas para AVL foram descartadas após o período de observação.

3.2.3 Obtenção de Culturas monoxênicas

Para as amostras de água que foram positivas para amebas de vida livre, isto é, que se verificava a presença de trofozoítos e cistos nas placas, a partir da microscopia óptica, realizou-se subcultivos dos isolados para obter 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 para localização dos isolados. Posteriormente as placas foram abertas sob condições de esterilidade, com auxílio de uma lâmina estéril, um pedaço de ágar da área marcada foi cortado. O pedaço de Agar era 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 10 dias.

3.2.4 Obtenção de culturas axênicas

Para o cultivo de AVL em meio líquido sem a presença de bactérias e outros contaminantes, os isolados de água de piscinas em culturas monoxênicas de no máximo 72 h de crescimento, constituídas de muitos trofozoítos, foram colocadas sob bolsas de gelo durante 15 min para desprender os trofozoítos da superfície do ágar. Uma alíquota de 5 mL do meio PYG foi adicionada à superfície do ágar e raspado gentilmente com alça de platina. A suspensão de AVL foi transferida para um tubo cônico estéril contendo 5 mL de PYG (ANEXO A) suplementado com antibióticos (400 UI/mL de Penicilina G Potássica e 400 µg/mL de Estreptomicina) e incubada 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.

3.2.5 Indução ao encistamento

Para obtenção de cistos, culturas axênicas de amebas foram centrifugadas a 250 x g por 10 min e os trofozoítos transferidos para tubos contendo 5 ml de solução salina de Page. Após 72 horas o sedimento era examinado para detectar a presença de cistos.

3.2.6 Coloração de cistos e trofozoítos

Culturas líquidas contendo cistos e trofozoítos foram primeiramente centrifugadas a 250 x *g* por 10 min. O sobrenadante foi retirado e o sedimento foi suspenso em 1 ml de tampão fosfato pH 7,2 (PBS). Este procedimento de lavagem foi realizado três vezes, após foi adicionado o fixador de Schaudinn (ANEXO A). Alíquotas de 100 µL foram espalhadas sobre lâminas de vidro limpas e desengorduradas. As lâminas foram secas em estufa bacteriológica a 37 °C durante três horas aproximadamente. Depois de fixadas, foram coradas pelo tricrômico conforme Garcia & Brückner, 1997 (ANEXO A).

3.3 Identificação morfológica de isolados do gênero *Acanthamoeba*

3.3.1 Exflagelação dos organismos

Com a finalidade de identificar e excluir amostras de *Naegleria fowleri* que poderiam ter sido isoladas das amostras de água de piscinas foi realizada a técnica de exflagelação. 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).

3.3.2 Análise Morfológica

As AVL isoladas de água de piscinas foram avaliadas morfológicamente de acordo com os aspectos dos trofozoítos (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004a). A análise dos cistos baseou-se na observação da sua dupla parede conforme os critérios descritos por Pussard & Pons (1977) e Page (1988).

O estudo morfométrico foi realizado a partir de lâminas coradas com tricrômico, utilizando ocular micrométrica (aumento de 1000X). Foram medidos 10 trofozoítos e 10 cistos de cada isolado para obtenção de uma média aritmética e cálculo de desvio padrão.

3.3.3 Tempo de contração dos vacúolos pulsáteis

O tempo de contração dos vacúolos pulsáteis foi determinado a partir da observação dos trofozoítos em culturas monoxênicas em microscópio óptico (aumento de 100X). O tempo de contração dos vacúolos pulsáteis foi cronometrado, iniciando a contagem a partir do fechamento do vacúolo e terminado o tempo após a abertura total do vacúolo e novo fechamento (DE CARLI, 2001). O tempo de contração dos vacúolos pulsáteis foi estimado a partir da média de 5 trofozoítos de cada isolado.

3.4 Estudo da patogenicidade de isolados de *Acanthamoeba* por testes de tolerância

Os isolados de *Acanthamoeba* spp. obtidos de amostras de água de piscinas de clubes de Porto Alegre-RS foram submetidos a testes de osmotolerância e termotolerância. Estes testes foram previamente usados como marcadores na diferenciação de isolados patogênicos e não-patogênicos, como descrito por Khan *et al.* (2001).

3.4.1 Teste de Osmotolerância

Para analisar o efeito da osmolaridade no crescimento de trofozoítos de *Acanthamoeba*, placas de ágar não-nutriente 1,5 %, cobertas com suspensão de *Escherichia coli* (ATCC 25922), contendo 0,5 M e 1,0 M de manitol foram utilizadas. Placas sob as mesmas condições, porém sem manitol foram usadas como controle do crescimento. Aproximadamente 1000 trofozoítos (inoculo de 25 µL com alcance de 5 mm do centro da placa) foram inoculados no centro das placas e incubadas a 30 °C por até 10 dias. O crescimento dos organismos foi determinado por contagem do número de cistos e trofozoítos a uma distância de aproximadamente 20 mm do ponto de inoculação. Para cada placa, cinco campos microscópicos foram quantificados (microscópio óptico, aumento de 100X). Todos os testes foram realizados em triplicata, com cada isolado de *Acanthamoeba* em uma placa individual. As contagens foram realizadas no décimo dia de incubação. Após as contagens, áreas das placas dos isolados submetidos às concentrações de 0,5 M e 1,0 M de manitol, foram marcadas e transferidas para placas de ágar não-nutriente 1,5 % com sobrecamada de *E. coli* e incubadas a 30 °C para avaliação da viabilidade.

3.4.2 Teste de Termotolerância

Para os testes de tolerância à temperatura, placas de ágar não-nutriente 1,5 % cobertas com suspensão de *E. coli* (ATCC 25922) foram utilizadas. Aproximadamente 1000 trofozoítos (inoculo de 25 µL com alcance de 5 mm do centro da placa) foram inoculados no centro das placas e incubadas a 30, 37 e 42 °C por até 10 dias. As placas submetidas a 30 °C foram utilizadas como controle na avaliação do crescimento. O crescimento dos organismos foi determinado por contagem do número de cistos e trofozoítos a uma distância de aproximadamente 20 mm do ponto de inoculação. Para cada placa, cinco campos microscópicos foram quantificados (microscópio óptico, aumento de 100X). Todos os testes foram realizados em triplicata, com cada isolado de *Acanthamoeba* em uma placa individual.

As contagens foram realizadas no décimo dia de incubação. Após as contagens, áreas das placas, dos isolados submetidos às temperaturas de 37 e 42 °C foram marcadas e transferidas para placas de ágar não-nutriente 1,5 % cobertas com suspensão de *E. coli* e incubadas a 30 °C para avaliação da viabilidade.

3.5 Identificação molecular dos isolados de *Acanthamoeba*

3.5.1 Extração de DNA total de *Acanthamoeba*

Para a extração de DNA total dos isolados de *Acanthamoeba* (Tabela 4) empregou-se o protocolo descrito por Salah & Iciar (1997) com algumas modificações. Uma quantidade inicial de 10^6 a 10^7 trofozoítos/mL de isolados de *Acanthamoeba* obtidas de culturas axênicas no 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-maria a 55 °C durante 1 hora e após, foi adicionado 300 µL de NaCl 6 M em cada uma. As amostras foram novamente agitadas em vórtex por 30 s e centrifugadas por 10 min a 10.000 x g. Ao sobrenadante foi adicionado 700 µL de álcool isopropílico e incubado a -20 °C por 1 hora. Após foram centrifugadas 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 ressuspensão em 100 µL de água ultra-pura esterilizada e quantificado em gel de agarose.

3.5.2 Quantificação do DNA de *Acanthamoeba*

A quantificação do DNA dos isolados de *Acanthamoeba* foi realizada por comparação da intensidade das bandas, em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL. Como controle utilizou-se um padrão de peso molecular de concentração conhecida (DNA ladder 50 pb, Ludwig biotecnologia).

3.5.3 Confirmação do gênero *Acanthamoeba* por Reação em Cadeia da Polimerase

A confirmação do gênero *Acanthamoeba* spp. dos isolados incluídos no estudo foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com base no protocolo de Mathers *et al.* (2000). Utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores, denominados “Primers” de Nelson, que amplificam a região 18S do rDNA em isolados de *Acanthamoeba*. A sequência de DNA dos oligonucleotídeos iniciadores foram:

Sense: 5' – GTT TGA GGC AAT AAC AGG T - 3'

Anti-sense: 5' – GAA TTC CTC GTT GAA GAT – 3'

A PCR foi realizada em volumes de 25 µL constituídos de 0,4 µM de cada oligonucleotídeo (Invitrogen™), 0,2 mM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 50 mM KCl₂, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 1,5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) e 30 ng de DNA molde.

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, 49 °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 usadas como controle positivo.

3.5.4 Amplificação do DNA de *Acanthamoeba* por RAPD

Os materiais genéticos submetidos ao estudo de RAPD foram obtidos a partir da extração de DNA dos isolados de *Acanthamoeba* e confirmados por PCR gênero-específico, como descrito anteriormente. Foram testados 10 oligonucleotídeos decâmicos (ORTEGA *et al.*, 2003) sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies (Tabela 2). As condições de reação foram padronizadas de acordo com o oligonucleotídeo utilizado. As alterações foram realizadas em alguns componentes da reação tais como: concentração de DNA, oligonucleotídeo, MgCl₂ e temperatura de anelamento.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores empregados nas reações de amplificação de RAPD para a caracterização de *Acanthamoeba*

Oligonucleotídeo	Seqüência
OPC-01	5'- TTCGAGCCAG - 3'
OPC-02	5'- GTGAGGCGTC - 3'
OPC-03	5'- GGGGGTCTTT - 3'
OPC-04	5'- CCGCATCTAC - 3'
OPC-05	5'- GATGACCGCC - 3'
OPC-06	5'- GAACGGACTC - 3'
OPC-07	5'- GTCCCGACGA - 3'
OPC-08	5'- TGGACCGGTG - 3'
OPC-09	5'- CTCACCGTCC - 3'
OPC-10	5'- TGTCTGGGTG - 3'

As reações de amplificação de DNA foram realizadas com base no protocolo de Williams *et al.* (1990) com algumas modificações. Para cada reação de RAPD foi utilizado um volume total de 25 µL contendo 30 ng de DNA molde, 0,8 µM de oligonucleotídeo

iniciador, 50 mM de KCl₂, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia) e 1 U de Taq DNA polimerase (Invitogen™).

A amplificação foi realizada em um termociclador “PTC-150 MiniCycler Hot Bonnet - MJ Research” programado para uma fase inicial de desnaturação de 94 °C por 5 min seguido de 40 ciclos de 94 °C por 2 min, 32 °C por 5 min, 72 °C por 2 min e uma extensão final de 72 °C por 10 min.

As reações de amplificação foram conduzidas com todos os oligonucleotídeos e com os 15 isolados de *Acanthamoeba* (Tabela 4). Todas as reações de RAPD foram repetidas no mínimo duas vezes, em dois experimentos separados para cada um dos isolados.

3.5.5 Análise dos Fragmentos amplificados por PCR e RAPD

Os produtos da amplificação PCR e RAPD foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5 %, corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL. Os géis foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta e fotografados em equipamento de foto documentação (“Kodak Digital Science™ DC120” versão 1.0.2). O DNA Ladder de 50 pb (Ludwig biotec) foi usado como marcador de peso molecular para comparar o tamanho dos fragmentos.

3.5.6 Cálculo das estimativas de distância genética entre os isolados

O peso molecular aproximado dos fragmentos visualizados nos géis foi determinado com o auxílio do programa Kodak 1D, versão 3.5.2. Fragmentos de DNA com tamanhos entre 200 e 1600 pb foram selecionados para análise. Os perfis monomórficos e polimórficos obtidos nos géis de eletroforese foram transformados em dados binários, construindo matrizes de caracteres discretos (1 para presença e 0 para ausência de fragmentos). Os dados foram analisados utilizando-se o programa SAS versão 9.1.3 “SAS Statistical Software, release 9.1., Cary N.C. SAS Institute, Inc., 2002-2003”. A similaridade genética entre os isolados foi

calculada com base em variáveis binárias utilizando-se o Coeficiente de Jaccard. O dendograma foi construído por um método hierárquico aglomerativo denominado Método da Ligação Média (“Average Linkage”).

3.6 Análises dos dados

Dados descritivos foram analisados através de cálculo de percentual, média e desvio padrão. O teste z foi utilizado para comparar as proporções de amostras positivas e negativas para piscinas térmicas e internas (PTI) e piscinas não-térmicas e externas (PE) e o teste T de student a 5% de probabilidade para verificar a influência dos parâmetros físico-químicos da água das piscinas quanto à presença de AVL. Todas as análises estatísticas foram realizadas no núcleo de assessoria estatística (NAE) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento de AVL em água de piscinas

Dos 22 clubes recreativos da cidade de Porto Alegre-RS submetidos à análise da água de suas piscinas, 8 (36,36%) indicaram a presença de AVL. Das 65 amostras de água analisadas 13 (20%) foram positivas para AVL, sendo 48 amostras coletadas de piscinas térmicas e internas (PTI) e 17 amostras de piscinas não-térmicas e externas (PE) (Tabela 3). Das 48 amostras de PTI, 10 (20,83%) foram positivas para AVL e das 17 amostras de água de PE, 3 (17,64%) foram positivas. Não houve diferença significativa entre as proporções de amostras positivas nas PTI e PE e entre as proporções de amostras negativas (Teste z, $p = 0,7784$).

As formas císticas e trofozoíticas foram observadas do 3º dia ao 15º dia após o cultivo das amostras de água em placas de ágar não nutriente cobertas com *E. coli* (Figura 10). Os trofozoítos apresentavam vacúolos pulsáteis evidentes, nucléolo bem definido e acantopódios. Outros organismos como bactérias e fungos também estavam presentes nas amostras na fase inicial de isolamento (Figuras 11 e 12). Após três a seis dias de cultivo, iniciava-se o processo de encistamento dos trofozoítos e os cistos tornavam-se mais numerosos. Subcultivos foram realizados para a obtenção de culturas monoxênicas a partir da técnica de seleção de áreas das placas sem contaminantes, sendo possível obter culturas de AVL apropriadas para os experimentos subseqüentes. A partir do isolamento em culturas monoxênicas os trofozoítos foram transferidos para o meio líquido (PYG suplementado com antibióticos) e todos os isolados foram axenizados (Figura 13). Na literatura é freqüente o relato da dificuldade em axenizar determinados isolados de AVL, principalmente em amostras ambientais (TSVETKOVA *et al.*, 2004). Segundo Schuster (2002) a maior dificuldade no isolamento de AVL de amostras do ambiente é estimular o crescimento das amebas e, ao mesmo tempo, inibir o crescimento de outros organismos.

Tabela 3 - Relação de clubes visitados, número de piscinas, tipo de piscina, número de amostras positivas e isolados obtidos

CLUBES	Nº DE PISCINAS	TIPO DE PISCINA	AMOSTRAS	ISOLADOS
P1	5	2 PTI / 3PE	2+ (1 PTI, 1 PE)	PO1 PTA1
P2	5	5 PTI	3+ (3 PTI)	PTA2 PTI2 PTH2
P3	2	2 PTI	1+ (1 PTI)	PTI3
P4	2	1 PTI / 1 PE	1+ (1 PE)	PI4
P5	6	6 PTI	2+ (2 PTI)	PTO5 PTI5
P6	3	3 PTI	2+ (2 PTI)	PTI6 PTM6
P7	2	2 PTI	-	
P8	2	2 PTI	1+ (1 PTI)	PTI8
P9	1	1 PTI	-	
P10	1	1 PTI	-	
P11	1	1 PTI	-	
P12	2	2 PTI	-	
P13	1	1 PTI	-	
P14	2	2 PTI	-	
P15	2	2 PTI	-	
P16	2	2 PTI	-	
P17	1	1 PTI	-	
P18	1	1 PTI	-	
P19	2	2 PTI	-	
P20	9	2 PTI / 7PE	-	
P21	7	4 PTI / 3PE	1+ (PE)	P21
P22	6	3 PTI / 3PE	-	
TOTAL:	65 amostras	48 PTI / 17 PE	13 amostras positivas	13 isolados 10 PTI/3 PE

PTI - piscina térmica e interna; PE - piscina não-térmica e externa.

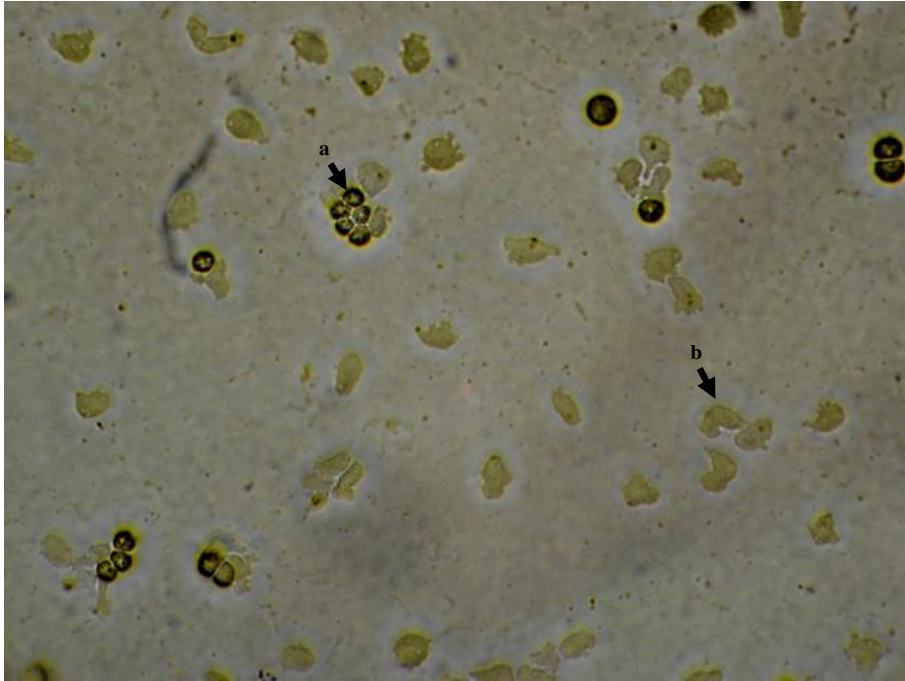


Figura 10 – Cistos ^a e trofozoítos ^b de *Acanthamoeba* em cultivo monoxênico. Microscópio óptico (100X).

Fonte: Karin Caumo

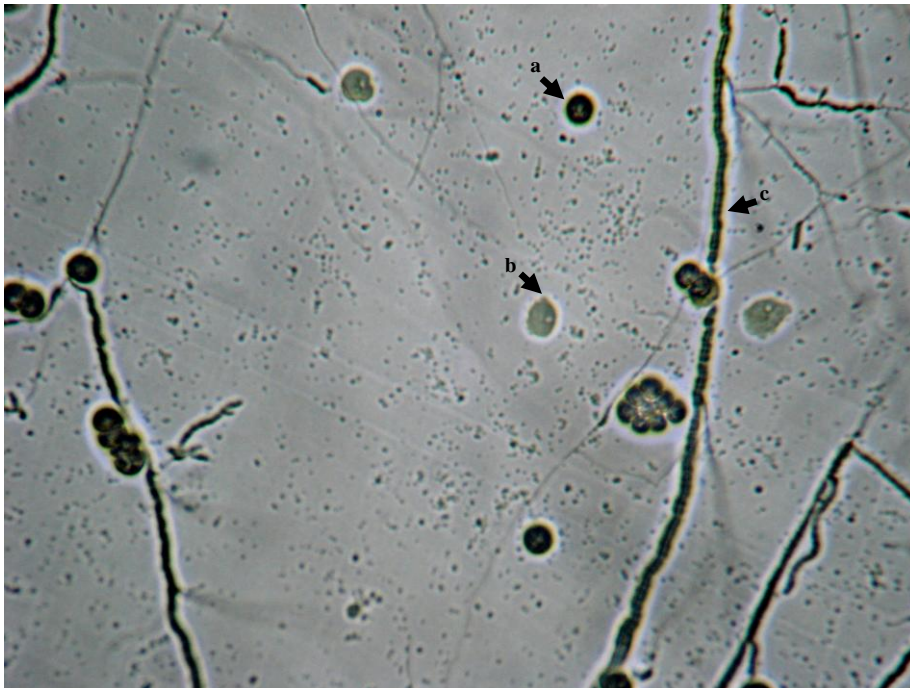


Figura 11 – Cistos ^a e trofozoítos ^b de *Acanthamoeba* em placa de ágar não-nutriente com crescimento de fungo filamentosos ^c. Microscópio óptico (100X).

Fonte: Laboratório de Parasitologia-UFRGS

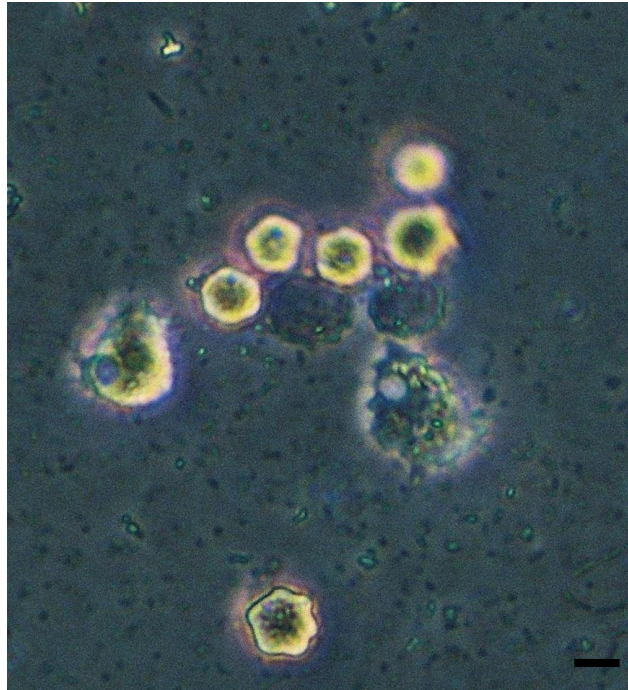


Figura 12 – Cultivo em meio líquido (PYG) de AVL com a presença de bactérias. Microscópio óptico invertido (1000X). Barra = 10µm

Fonte: Karin Caumo

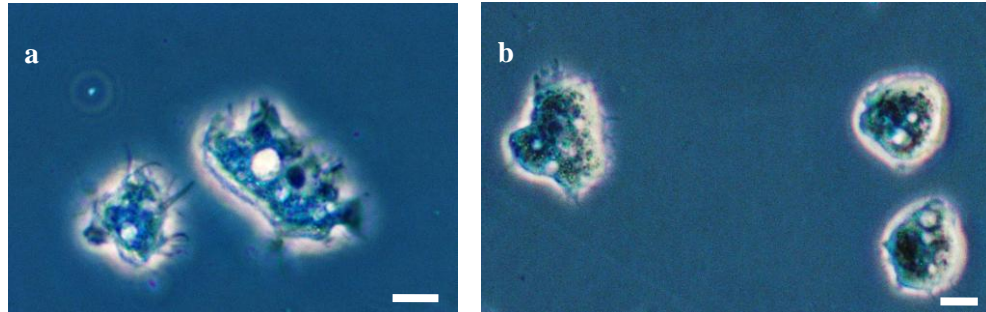


Figura 13 – Trofozoítos ^{a, b} de *Acanthamoeba* em cultivo axênico. Microscópio de contraste de fase. Aumento de 1000X. Barra = 5 µm.

Fonte: Karin Caumo

Vários estudos têm sido desenvolvidos em sistemas de água, rios e piscinas a fim de determinar a abundância de AVL em ambientes aquáticos relacionados a habitats humanos (RADFORD *et al.* 1998; BOOTON *et al.* 2002; ETTINGER *et al.* 2003; SEAL *et al.* 2003). Alguns autores relatam que os cistos destas amebas chegam até as piscinas por diversos meios: através da água de abastecimento, pelo ar ou até mesmo pelos próprios banhistas, uma vez que elas estão presentes no solo (Revisado em MUNÕZ *et al.* 2003). Estudos realizados

na Polônia demonstraram a presença de AVL em 59,7% das amostras de água coletadas de piscinas na cidade de Szczecin (GÓRNIK & KUŻNA-GRYGIEL, 2004). Na Finlândia, de 12 amostras de água obtidas de piscinas, 4 foram positivas para AVL, com o isolamento dos gêneros: *Acanthamoeba*, *Vexillifera*, *Flabellula*, *Hartmannella* e *Rugipes* (VESALUOMA, 1995). Outro trabalho de isolamento de AVL relacionado a fontes de água foi o realizado em James River - EUA, onde um total de 330 amostras foi analisado, amebas de cinco gêneros distintos foram observadas em 43,3% das amostras (ETTINGER *et al.*, 2003). No Brasil existem alguns estudos da presença de AVL em águas de piscinas, como o realizado no Distrito Federal por Alves (2006), onde de 33 amostras coletadas, 13 (39,39%) foram positivas para AVL com a presença dos gêneros *Naegleria*, *Acanthamoeba* e *Vannella*. Moura (1980) avaliou 10 piscinas de clubes da cidade do Rio de Janeiro durante um ano, e verificou a presença de AVL em todas as piscinas estudadas. Os gêneros mais frequentemente isolados foram: *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Naegleria*, *Vahlkampfia* e *Vannella*. Chaves *et al.* (1985), num estudo realizado entre 1981 e 1982 isolaram espécies de *Acanthamoeba* e *Naegleria* além de outras AVL em águas de piscinas na cidade de Campo Grande, no Mato Grosso do Sul.

O estudo da presença de AVL em fontes de água para uso recreacional é claramente importante na exposição de humanos a amebas potencialmente patogênicas representando um fator de risco para usuários suscetíveis ao desenvolvimento de ceratite, meningoencefalite, encefalite amebiana granulomatosa, entre outras patologias causadas por estes protozoários (LORENZO-MORALES *et al.* 2005c).

4.2 Avaliação dos parâmetros físico-químicos da água de piscinas

Os parâmetros físico-químicos da água das piscinas em estudo, tais como, temperatura, pH e cloro residual livre, foram avaliados, com a finalidade de observar a influência destes fatores na presença de *Acanthamoeba*. Todas as piscinas 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. A média dos valores dos parâmetros físico-químicos da água das piscinas são apresentados na figura 14.

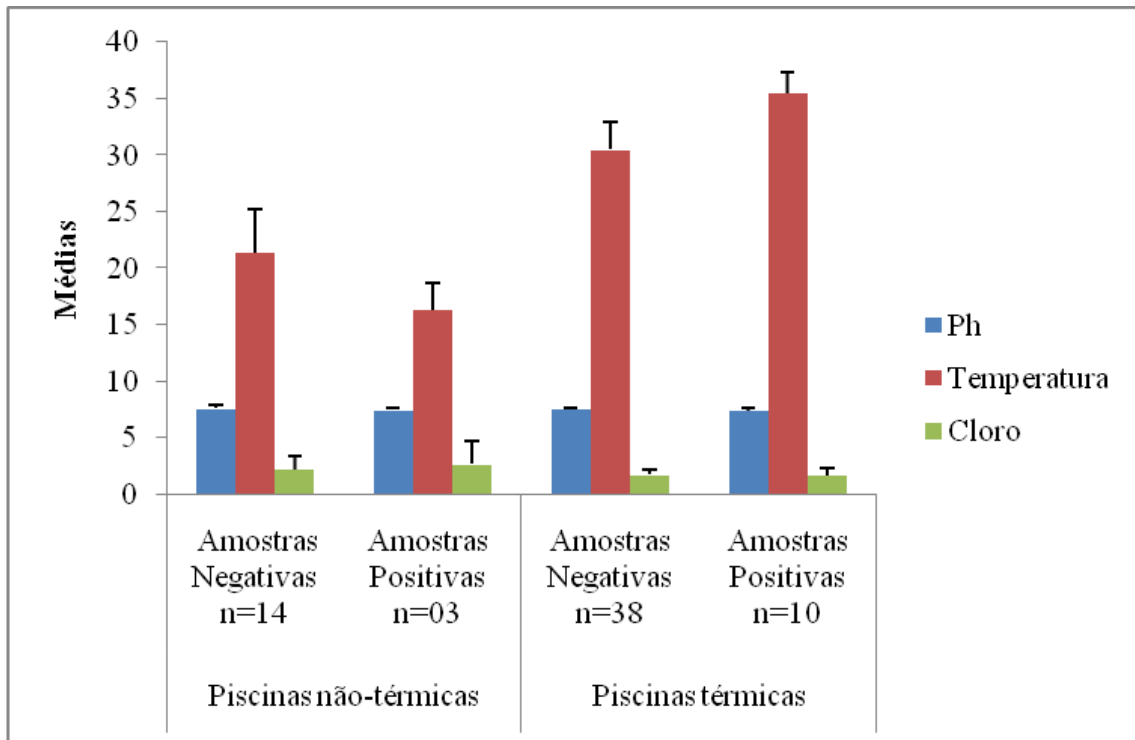


Figura 14 - Médias dos valores correspondentes aos parâmetros físico-químicos da água de piscinas térmicas e não-térmicas.

Não foram observadas diferenças significativas entre amostras positivas para AVL e amostras negativas pelos indicadores físico-químicos a partir do teste t Student a 5% de probabilidade. Obteve-se para temperatura $p = 0,8160$, para pH $p = 0,1319$, para cloro $p = 0,8227$, observando-se que não houve influência da temperatura, do pH e do cloro na presença ou ausência de AVL nas piscinas analisadas.

Os relatos sobre a influência da temperatura e do pH na detecção de AVL são escassos. Entretanto, o que foi observado neste estudo está de acordo com Silva & Rosa (2003), os quais citaram que estas amebas são resistentes a importantes variações de temperatura e de pH. Estudo realizado por Falchi (2006) em água de diferentes pontos da Laguna dos Patos em Rio Grande, RS, a temperatura (variação de 12 a 29°C, $P > 0,05$) e o pH (variação de 6 a 8, $P > 0,05$) das águas analisadas não influenciaram na frequência de AVL dos gêneros em estudo, *Acanthamoeba* e *Naegleria*.

A respeito do uso de agentes desinfetantes como cloro, bromo e antifúngicos, estes são muito eficazes para diminuir a flora bacteriana e micótica, porém sobre a população amebiana as concentrações utilizadas não o são, visto que os cistos de *Acanthamoeba* são altamente resistentes e podem sobreviver em até 50 ppm de cloro livre (KILVINGTON, 1991). No

México, Rivera *et al.* (1993), demonstraram que a concentração de cloro comumente usada em piscinas (0,5 a 1,5 mg/mL) não era suficiente para eliminar cistos de AVL. Alguns autores afirmam ainda que o cloro possa favorecer o desenvolvimento de amebas, uma vez que diminui a quantidade de fungos e algas que competem com as mesmas (GRIFFIN, 1972). A concentração aceitável de cloro livre nas piscinas na cidade de Porto Alegre, pela norma vigente é de 1 a 1,5 mg/L. No presente estudo, evidenciou-se que estas concentrações de cloro recomendadas para o tratamento da água de piscinas de clubes recreativos não são suficientes para eliminar cistos viáveis de *Acanthamoeba*. Em nosso estudo, evidenciou-se que todas as piscinas analisadas eram cloradas, com concentrações variando entre 1 a 4 mg/L, o que provavelmente inibiu a proliferação e a permanência de cistos de *Naegleria*, porém não influenciou na presença de *Acanthamoeba*, uma vez que, dos 22 clubes analisados, 8 deles foram positivos para este organismo. Cursons *et al.* (1980) observaram em um estudo, que o número de isolados do gênero *Acanthamoeba* após a desinfecção do ambiente com cloro, era maior que o de *Naegleria* spp. indicando a maior resistência de *Acanthamoeba*, mostrando que a concentração de cloro de aproximadamente 0,79 mg/L era suficiente para eliminar organismos do gênero *Naegleria*. Em estudo realizado por Alves (2006) no Distrito Federal (DF), as piscinas também eram cloradas, apesar de não terem realizado medidas para a verificação de cloro, observa-se que não houve influência deste para a presença de protozoários, uma vez que 39,39% das piscinas foram positivas para AVL com a presença de formas evolutivas do gênero *Acanthamoeba*, *Naegleria* e *Vannella*. Neste mesmo estudo, um dos clubes analisados e que apresentou ausência de AVL em suas piscinas, utilizava sal grosso no tratamento da água.

A característica do gênero *Acanthamoeba* de encistar-se em condições adversas e o acúmulo de sujidades trazidas pelo contato externo (ar, poeira e humanos) pode dificultar a manutenção adequada da desinfecção de piscinas em uma base contínua. Para diminuir os fatores de contaminação da água de piscinas quando a desinfecção é insuficiente, estas podem ser limpas minuciosamente e regularmente para evitar a formação de biofilmes que podem servir de alimento para as AVL por constituir-se em reduto de bactérias, fungos e matéria orgânica.

4.3 Identificação Morfológica dos isolados de AVL

4.3.1 Teste de exflagelação

O teste de exflagelação foi negativo para os 13 isolados de AVL obtidos das amostras de água de piscinas, indicando não haver nenhum isolado de *Naegleria fowleri*. O gênero *Naegleria* possui como uma de suas características, a capacidade de transformação do trofozoíto da forma amebóide para uma forma flagelada com dois flagelos anteriores, podendo três ou quatro flagelos serem vistos ocasionalmente, o que também pode ser induzido “in vitro” quando submetidas a situações adversas como a privação de nutrientes (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008b). Esta transformação é um estágio transitório e acredita-se que esses flagelos sejam usados para que a ameba possa se dispersar pelo ambiente em busca de condições favoráveis (SCHUSTER & VISVESVARA, 2004b). Entretanto, espécies de *Naegleria* têm sido identificadas com base no seqüenciamento de DNA, pois a habilidade de se transformar na forma flagelada pode ser perdida (DE JONCKHEERE, 2002). Estas informações nos fazem suspeitar da identificação morfológica e partir para a confirmação molecular dos isolados. Uma explicação para a ausência de isolamento de *Naegleria* a partir das amostras analisadas neste trabalho pode ser devido à fragilidade do gênero frente ao uso de desinfetantes, pois seus cistos podem sobreviver em condições adversas, mas são mais vulneráveis que os cistos de *Acanthamoeba* (VISVESVARA & SCHUSTER, 2008b). De acordo com Mazur *et al.* (1995) a baixa frequência de isolados de *Naegleria fowleri* em piscinas cloradas se deve a fraca habilidade de sobrevivência de seus cistos, que não sobrevivem mais de seis meses, enquanto os cistos de *Acanthamoeba* podem sobreviver por mais de 10 anos (GORNIK & KUŻNA-GRYGIEL, 2004). No estudo realizado por Górník & 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. O mesmo foi verificado nas piscinas analisadas na Finlândia, em que também não se detectou a ocorrência de AVL do gênero *Naegleria* (VESALUOMA *et al.*, 1995). Estes resultados estão em concordância com os encontrados do presente estudo.

No trabalho realizado por Alves (2006) no Distrito Federal, dentre os isolados selecionados para a caracterização morfológica dos gêneros, observou-se a maior frequência do gênero *Naegleria* nos isolados de água de piscinas, talvez porque as coletas tenham sido realizadas na época de chuvas da região, embora o gênero *Acanthamoeba* seja reconhecidamente predominante em amostras ambientais.

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 piscinas foram sugestivos de pertencer ao gênero *Acanthamoeba* de acordo com as características morfológicas (Tabela 4) (Figura 17 a 29). Os isolados apresentaram trofozoítos com locomoção lenta, citoplasma com zona periférica hialina, acantopódios ou filopódios, nucléolo bem definido e a presença de vacúolos pulsáteis no citoplasma (Figura 15). As medidas dos cistos e trofozoítos foram compatíveis com o gênero, conforme descrito por Schuster & Visvesvara, 2004a.

Neste trabalho empregou-se a classificação de Pussard & Pons (1977), que divide o gênero *Acanthamoeba* em 3 grupos de acordo com características do tamanho e dos aspectos morfológicos gerais dos cistos. Os cistos foram caracterizados pela forma do endocisto e ectocisto (Figura 16). Nove isolados foram classificados como pertencentes ao grupo morfológico II e 4 isolados ao grupo morfológico III. Nenhum isolado apresentou características do grupo I. No grupo II estão classificadas as espécies mais comumente isoladas do ambiente (PAGE, 1967). Neste grupo estão também as espécies de *Acanthamoeba* responsáveis pela maioria dos casos de meningoencefalites e ceratites (STOTHART *et al.*, 1998). Os vacúolos pulsáteis foram evidentes no citoplasma de todos os isolados e o tempo de contração dos vacúolos, que desaparecem e reaparecem em intervalos de 45 a 50 segundos para o gênero *Acanthamoeba* (DE CARLI, 2001), foi característico para a maioria dos isolados com exceção de *A. castellanii* Neff (30010), PO1, PTI2 e PTI5 que apresentaram tempos de contrações inferiores ao intervalo mencionado.

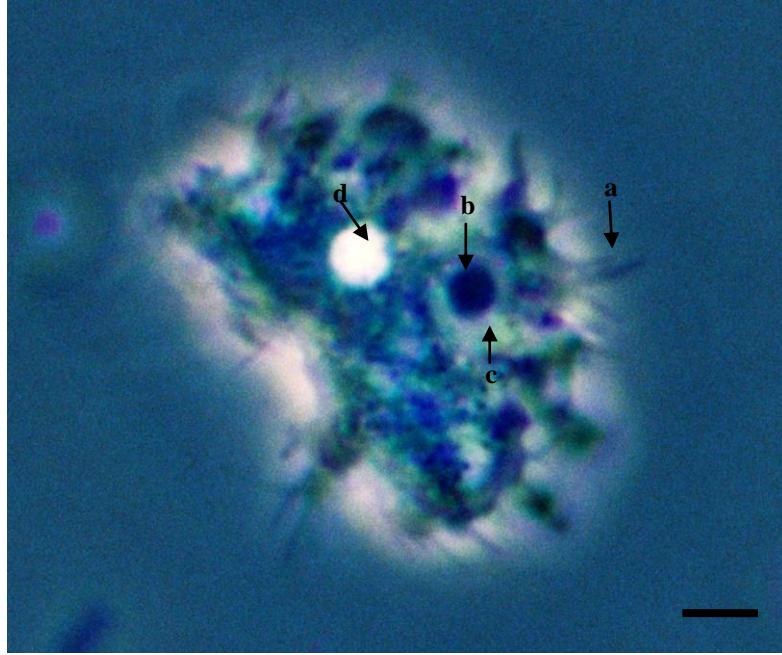


Figura 15 - Trofozoíto característico do gênero *Acanthamoeba*. (a) acantopódios; (b) nucléolo; (c) núcleo; (d) vacúolo pulsátil. Microscópio de contraste de fase. Aumento de 1000X. Barra = 5 µm
Fonte: Karin Caumo

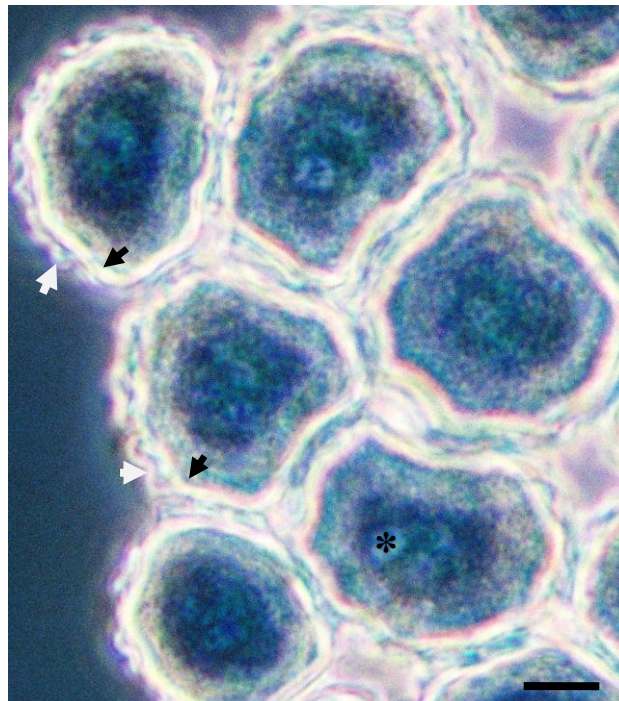


Figura 16 - Dupla parede dos Cistos de *Acanthamoeba*. Ectocisto (seta branca) e endocisto (seta preta). Núcleo evidente*. Microscópio de contraste de fase. Aumento de 1000X. Barra = 4 µm.
Fonte: Karin Caumo

Isolados	ATCC	Fontes	Média Diâmetro dos Cistos ^a µm ± DP	Média Diâmetro dos Trophozoites ^a µm ± DP	Grupo Morfológico (Pussard & Pons, 1977)	Tempo de Contração de Vacúolos ^b ± DP
<i>A. castellanii</i> Neff	30010	Solo	14,8 ± 1,0	16,7 ± 1,4	II	35,6 ± 2,4
<i>A. castellanii</i> T4	50492	Ceratite	12,4 ± 0,8	17,1 ± 1,5	II	49,6 ± 3,8
PO1		AP	12,1 ± 0,7	16,2 ± 2,3	II	40,8 ± 1,9
PTA1		AP	17,6 ± 1,3	24,4 ± 2,5	II	45,0 ± 2,2
PTA2		AP	11,2 ± 0,4	19,8 ± 1,4	II	50,2 ± 2,9
PTI2		AP	14,4 ± 0,3	22,3 ± 1,3	III	38,4 ± 2,2
PTH2		AP	14,9 ± 0,5	22,3 ± 2,0	III	47,0 ± 3,5
PTI3		AP	12,1 ± 0,9	21,0 ± 1,4	III	44,6 ± 3,2
PI4		AP	11,2 ± 0,4	15,2 ± 0,8	II	47,2 ± 2,4
PTO5		AP	12,0 ± 0,3	22,5 ± 0,7	II	46,6 ± 1,8
PTI5		AP	12,9 ± 1,1	21,2 ± 2,4	II	35,4 ± 1,3
PTI6		AP	11,9 ± 0,5	21,1 ± 1,3	II	49,8 ± 2,4
PTM6		AP	13,8 ± 1,5	23,8 ± 2,1	II	48,0 ± 1,6
PTI8		AP	12,8 ± 0,6	23,6 ± 1,3	III	47,0 ± 2,2
P21		AP	10,8 ± 0,7	16,5 ± 1,5	II	50,0 ± 1,6

AP – Água de piscina; DP – Desvio Padrão. ^aO estudo morfométrico foi determinado pela média da medida de 10 cistos e 10 trofozoítos de cada isolado. ^bA média do tempo de contração dos vacúolos pulsáteis foi estimado a partir da análise de 5 trofozoítos de cada isolado.

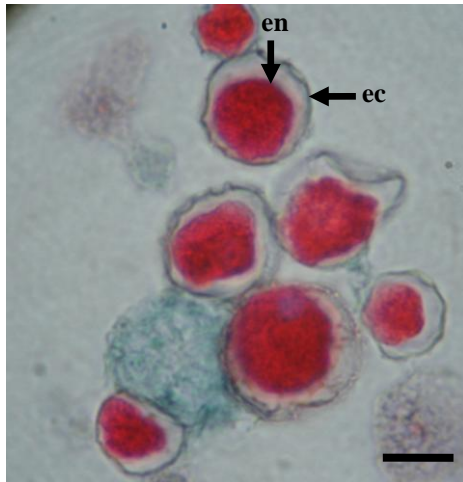


Figura 17 – Cistos de *Acanthamoeba* do isolado PO1 corados com tricrômico. Microscópio óptico 1000X; barra = 6 μ m. en: endocisto; ec: ectocisto.

Fonte: Karin Caumo

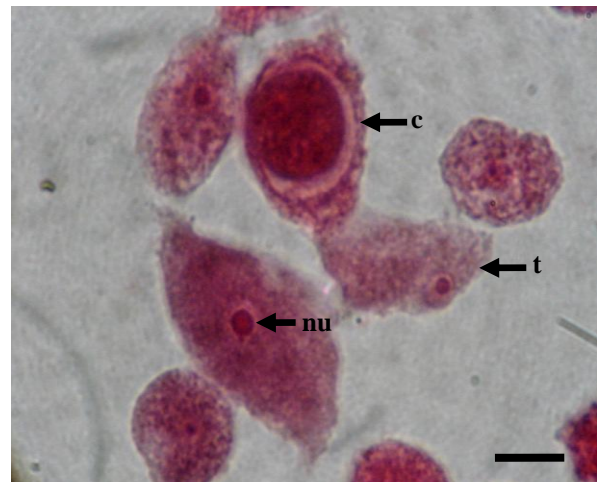


Figura 18 – Trofozoítos de *Acanthamoeba* do isolado PTI3 corados com tricrômico. Microscópio óptico 1000X; barra = 10 μ m. c: cisto; t: trofozoítos; nu: núcleo.

Fonte Karin Caumo

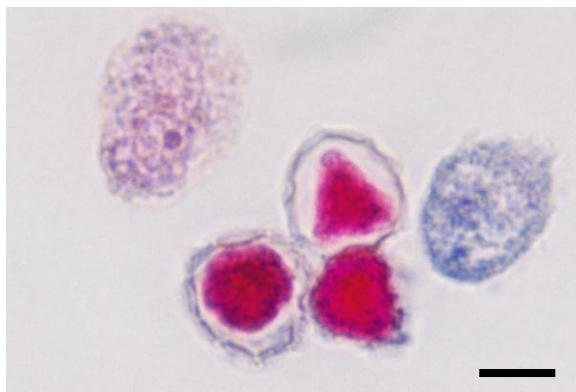


Figura 19 – Cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* do isolado PTO5 corados com tricrômico. Microscópio óptico 1000X; barra = 10 μ m.

Fonte: Karin Caumo



Figura 20 – Cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* do isolado PTI5 corados com tricrômico. Microscópio óptico 1000X; barra = 6 μ m.

Fonte: Karin Caumo

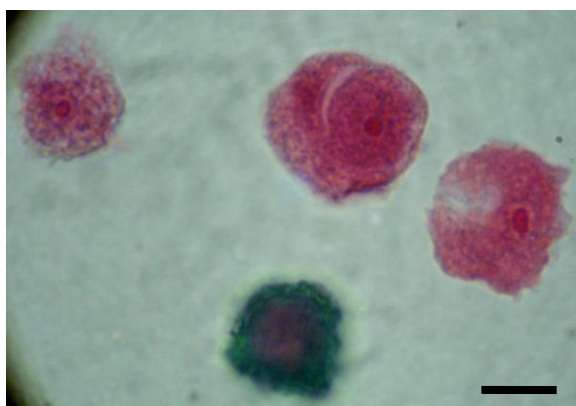


Figura 21 – Trofozoítos e cisto de *Acanthamoeba* do isolado PTM6 corados com tricrômico. Microscópio óptico 1000X; barra = 10 μ m.

Fonte: Karin Caumo

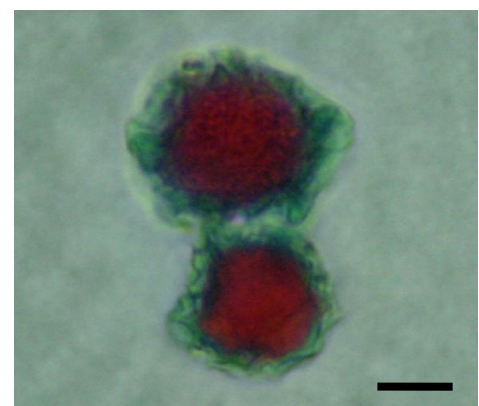


Figura 22 – Cistos de *Acanthamoeba* do isolado PTM6 corados com tricrômico. Microscópio óptico 1000X; barra = 6 μ m.

Fonte: Karin Caumo

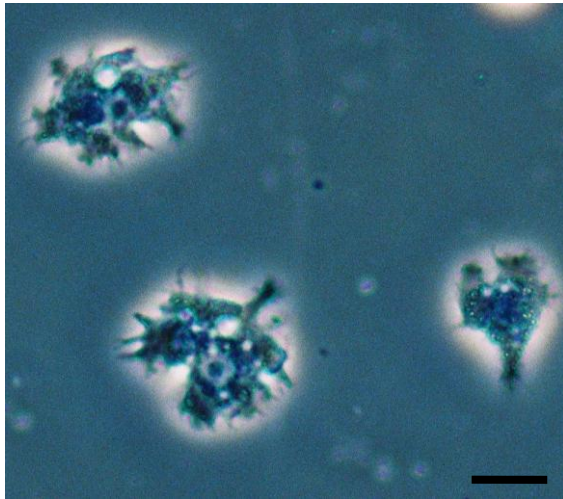


Figura 23 – Trofozoítos de *Acanthamoeba* do isolado P21. Microscópio de contraste de fase (400X); barra = 9 μm .

Fonte: Karin Caumo

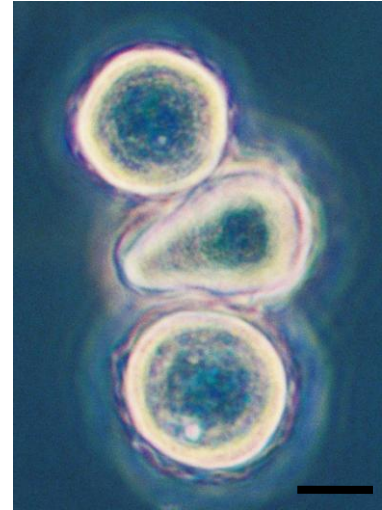


Figura 24 – Cisto de *Acanthamoeba* do isolado P21, grupo II. Microscópio de contraste de fase (1000X); barra = 6 μm .

Fonte: Karin Caumo

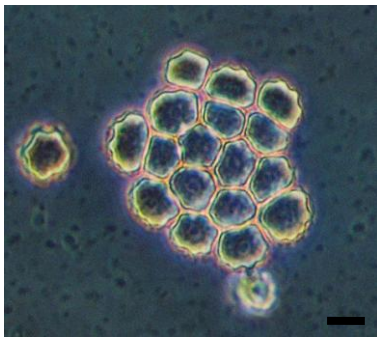


Figura 25 – Isolado de *Acanthamoeba* (PTI6), cistos do grupo II. Microscópio de contraste de fase (400X); barra = 10 μm .

Fonte: Karin Caumo

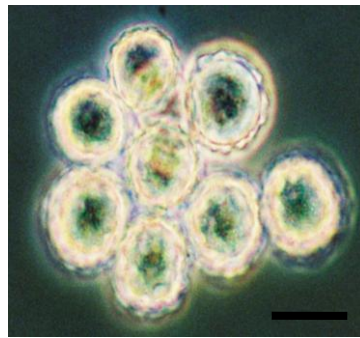


Figura 26 – Isolado de *Acanthamoeba* (PTA2), cistos do grupo II. Microscópio de contraste de fase (1000X); barra = 11 μm .

Fonte: Karin Caumo

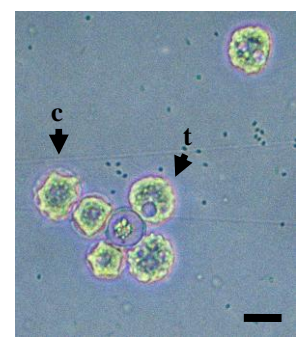


Figura 27 – Isolado de *Acanthamoeba* (PTI5), cistos do grupo II. Microscópio óptico 400X; barra = 12 μm . c: cisto; t: trofozoíto.

Fonte: Karin Caumo

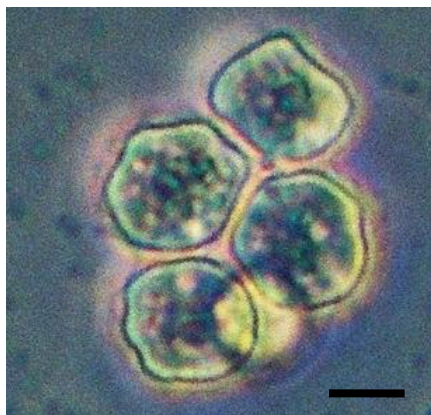


Figura 28 – Isolado de *Acanthamoeba* (PTI2), cistos do grupo III. Microscópio de contraste de fase (1000X); barra = 7 μm .

Fonte: Karin Caumo

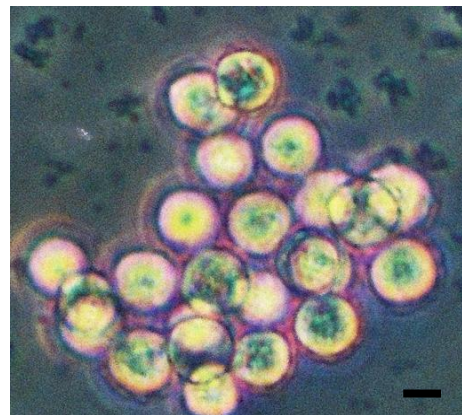


Figura 29 – Isolado de *Acanthamoeba* (PTI8), cistos do grupo III. Microscópio de contraste de fase (1000X); barra = 6 μm .

Fonte: Karin Caumo

Atualmente a classificação de espécies de *Acanthamoeba* tem sido realizada com ferramentas moleculares (STOTHARD *et al.*, 1998). Não foi utilizada neste estudo a chave dicotômica de Page (1988) para a classificação dos isolados em nível de espécie, uma vez que, a caracterização morfológica é pouco precisa, uma vez que a distinção entre as espécies é difícil de ser estabelecida com segurança e o uso da morfologia como único critério taxonômico é limitado pela variação da forma do cisto dentro de um clone (PAGE, 1988; VISVESVARA, 1991; MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; SILVA & ROSA, 2003).

Os resultados encontrados no presente estudo são semelhantes aos resultados encontrados mundialmente por muitos autores que isolaram cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* a partir de água de torneira, rios, piscinas, solo, poeira, entre outros ambientes (RADFORD *et al.* 1998; BOOTON *et al.* 2002; ETTINGER *et al.* 2003; SEAL *et al.* 2003; KILVINGTON *et al.* 2004; LORENZO-MORALES *et al.* 2005a), sendo o gênero mais isolado, principalmente devido à resistência de seus cistos às variações ambientais (BARBEAU & BUHLER, 2001; KHAN, 2003; SCHUSTER & VISVESVARA, 2004a). Na Turquia, de 30 amostras de água e solo analisadas, todos os isolados de AVL foram classificados como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*, indicando claramente sua natureza ubiqüitária (KILIC *et al.*, 2004). A presença de *Acanthamoeba* foi detectada em mais da metade das piscinas analisadas na Polônia (GÓRNIK & KUŻNA-GRYGIEL, 2004) devido à resistência destas amebas à cloração e também à precipitação atmosférica e poluição orgânica transportada por pessoas. Já na Finlândia, 8% das amostras foram positivas para o gênero sendo a baixa ocorrência justificada pela limpeza e desinfecção eficientes das piscinas analisadas (VESALUOMA *et al.*, 1995). Em um estudo de isolamento de AVL de piscinas públicas realizado em 2003 em Santiago do Chile, de 64 amostras analisadas, 14 foram positivas para AVL, sendo 3 isolados pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* (MUNÓZ *et al.*, 2003).

Na Laguna dos Patos em Rio Grande, RS, também foi observado a maior frequência do gênero *Acanthamoeba* frente a outros protozoários analisados em 12 pontos de coleta de água durante o período de doze meses, e foi observado que 11 dos 12 pontos analisados estavam contaminados por *Acanthamoeba* spp. (91,7%) (FALCHI, 2006).

Fontes de água tanto para beber como para uso recreacional são claramente importantes na exposição de humanos a *Acanthamoeba* e, provavelmente, para o desenvolvimento de ceratite amebiana (LORENZO-MORALES *et al.*, 2005c). Ruthes *et al.* (2004) diagnosticaram conjuntivite por *Acanthamoeba* spp. em quatro pacientes do hospital de olhos do Paraná. Um dos pacientes não usava lentes de contato, mas semanalmente tomava banho de piscina em um clube. Os autores sugeriram que este foi o fator que propiciou a infecção ocular pelo protozoário.

A presença de *Acanthamoeba* em piscinas pode ser explicada pela resistência de seus cistos à cloração da água, e à provável limpeza e desinfecção insuficientes das instalações. Estudos de AVL presentes em piscinas por De Jonckheere (1979a, 1979b) mostraram que as amebas, especialmente o gênero *Acanthamoeba*, são provavelmente introduzidas na água através do solo e por humanos, não sendo encontradas permanentemente na água clorada. Como as piscinas são fontes de AVL muito difíceis de controlar, torna-se ainda mais importante o estudo da presença de AVL e a determinação do gênero e espécies existentes, a fim de tomar as precauções pertinentes e eliminar ou diminuir a presença destes organismos que podem ser patogênicos ao homem.

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

O potencial patogênico dos isolados de piscinas obtidos neste estudo foi determinado pelos testes de osmotolerância e termotolerância estabelecidos por Khan *et al.* (2001) (Tabela 5). Dos treze isolados do gênero *Acanthamoeba* submetidos à análise, todos exibiram crescimento à temperatura de 37 °C e 0,5 M de manitol, nove isolados (69 %) cresceram a 42 °C e sete isolados (54 %) exibiram crescimento em alta concentração osmolar (1 M de manitol). Todos os isolados que cresceram a 1 M de manitol e também cresceram a 42 °C (38 %) foram considerados potencialmente patogênicos (PO1, PI4, PTI5, PTI6 e PTM6). Os isolados que cresceram a 42 °C e não cresceram a 1 M de manitol (23 %) (PTI2, PTH2 e PTI3) ou cresceram a 1 M de manitol e não cresceram a 42 °C (8 %) (PTI8) foram considerados com potencial patogênico baixo, e os que não cresceram a 42 °C e 1 M de manitol (31 %) foram considerados não-patogênicos (PTA1, PTA2, PTO5 e P21).

Tabela 5 - Diferenciação da patogenicidade de isolados de *Acanthamoeba* por testes de tolerância

Isolados	ATCC	Temperatura de crescimento		Crescimento em Manitol		Patogenicidade*
		37°C	42°C	0.5 M	1 M	
<i>A. castellanii</i> Neff	(30010)	+++	-	++	-	Não- patogênico
<i>A. castellanii</i> T4	(50492)	+++	++	+++	++	Potencialmente Patogênico
PO1		++	+	+++	+	Potencialmente Patogênico
PTA1		+++	-	+++	-	Não-patogênico
PTA2		+++	-	+++	-	Não-patogênico
PTI2		+++	++	+++	-	Baixo potencial patogênico
PTH2		+++	++	+++	-	Baixo potencial patogênico
PTI3		+++	++	++	-	Baixo potencial patogênico
PI4		+++	+	+++	++	Potencialmente Patogênico
PTO5		+++	-	++	-	Não-patogênico
PTI5		+++	++	+++	++	Potencialmente patogênico
PTI6		+++	+	+++	+++	Potencialmente patogênico
PTM6		+++	+++	+++	+++	Potencialmente patogênico
PTI8		+++	-	+++	++	Baixo potencial patogênico
P21		+++	-	+++	-	Não- patogênico

(-) ausência de crescimento de *Acanthamoeba*; (+) 1 a 15 cistos e/ou trofozoítos; (++) 16 a 30 cistos e/ou trofozoítos, e (+++) > 30 cistos e/ou trofozoítos. Avaliação feita em cinco campos microscópicos (100X).

*Critérios estabelecidos por Khan *et al.*, 2001.

Os isolados de referência da ATCC utilizados como controle nestes experimentos apresentaram os resultados esperados, uma vez que, *A. castellanii* Neff (ATCC 30010), não patogênica, não cresceu em concentração osmolar (1M de manitol) e temperatura elevadas (42°C), enquanto *A. castellanii* T4 (ATCC 50492), obtida de um caso de ceratite, cresceu nessas condições, indicando seu potencial patogênico. Todos os isolados permaneceram viáveis quando submetidos ao teste de viabilidade.

A variação do crescimento dos isolados em concentração osmolar e temperatura aumentadas pode estar relacionada à virulência, uma vez que, um isolado considerado potencialmente patogênico pode ser mais ou menos virulento dependendo de sua capacidade de adaptação e viabilidade nos tecidos do hospedeiro, que são fatores relacionados ao desenvolvimento da patologia. Isto indica, por exemplo, que o isolado PTM6, que apresentou crescimento de mais de trinta cistos, e ou trofozoítos por campo microscópico (+++) nos testes de tolerância, talvez seja mais virulento que o isolado PO1(+).

Alguns trabalhos têm mostrado que isolados patogênicos de *Acanthamoeba* exibem crescimento à temperatura e osmolaridade aumentadas (DE JONCKHEERE, 1983; KHAN *et al.*, 2002) e estes determinantes podem ser usados na diferenciação e prévia caracterização de isolados clínicos e ambientais correlacionados a testes de efeito citopático (KHAN *et al.*, 2001). Embora alguns isolados ambientais, tais como alguns dos isolados analisados neste trabalho, possam não ser patogênicos, eles têm grande importância epidemiológica, uma vez que, podem ser veículos de bactérias patogênicas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Legionella pneumophila*, entre outros (BARKER & BROWN, 1994).

O aquecimento global tem causado preocupação em relação ao aumento de infecções e doenças parasitárias, incluindo as patologias causadas por amebas de vida livre (COOK, 1992; PATZ *et al.*, 2000). O aumento da temperatura do ambiente pode realçar o crescimento de espécies termotolerantes, que podem ser melhor adaptadas a infecções humanas e outros mamíferos. Alguns trabalhos relatam que isolados de *Acanthamoeba* não-virulentos e não-patogênicos são incapazes de crescer a temperaturas superiores a 37 °C (VISVESVARA, 1980; DE JONCKHEERE, 1991). Entretanto, são também reportados casos de isolamento de amebas não-patogênicas, 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). Em estudo realizado por Hong *et al.*

(2000), 60% dos isolados de água de torneira foram osmotolerantes e termotolerantes, mas somente 20% mostraram a expressão de serino-protease que é indicativo de virulência.

4.5 Identificação molecular dos isolados de *Acanthamoeba*

4.5.1 Confirmação do gênero *Acanthamoeba* por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os 13 isolados obtidos no presente estudo caracterizados morfologicamente como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* foram confirmados por PCR. O produto de amplificação esperado de 229 pb foi observado em todos os isolados incluindo os controles positivos de *Acanthamoeba castellanii* Neff e T4 (ATCC 30010 e 50492) (Figura 30).

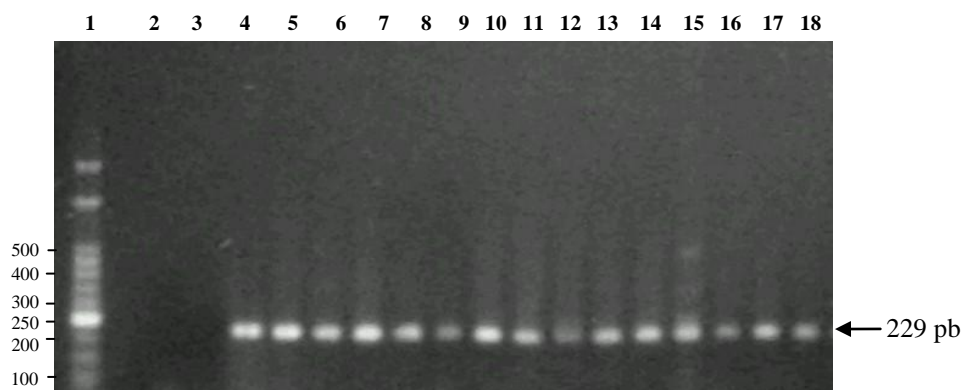


Figura 30 – Análise molecular do gene 18S ssu rDNA. (1) Marcador de peso molecular (50 bp), (2) Controle negativo, (3) *E.coli* (ATCC 25922), (4) *A. castellanii* T4 (ATCC 50492), (5) *A. castellanii* Neff (ATCC 30010), (6) PO1, (7) PTA1, (8) PTA2, (9) PTI2, (10) PTH2, (11) PTI3, (12) PI4, (13) PTO5, (14) PTI5, (15) PTI6, (16) PTM6, (17) PTI8, (18) P21.

Segundo Mathers *et al.* (2000) e Tsvetkova *et al.* (2004), a PCR é sensível e específica para a detecção de AVL e é usada para o diagnóstico confirmatório de infecção e diagnóstico ambiental. A fim de complementar os testes convencionais para diferenciação de AVL, o diagnóstico por PCR utilizando oligonucleotídeos gênero-específico de seqüências 18S do rDNA tem sido realizado por diversos pesquisadores na identificação de *Acanthamoeba* de várias fontes ambientais (HOWE *et al.*, 1997; MATHERS *et al.*, 2000; SCHOROEDER *et al.*, 2001; BOOTON *et al.*, 2002), *Naegleria fowleri* (MCLAUGHLIN *et al.*, 1991; KILVINGTON & BEECHING, 1995; LEDEE *et al.*, 1998) e *Hartmanella* (TSVETKOVA *et al.*, 2004).

A determinação correta da taxonomia dentro do gênero é um fator essencial para que se possa chegar a generalizações e conclusões acerca da ecologia, patogenicidade e epidemiologia, relacionadas a qualquer patógeno, uma vez que a falta de linhagens bem definidas causa grandes equívocos na comparação de diversos casos estudados. Vários pesquisadores têm reportado o uso de culturas de isolados clínicos para confirmar a presença de *Acanthamoeba* por PCR. Devido ao grande número de organismos avaliados a partir de culturas, este método mostra-se superior para a confirmação do gênero. Em nosso estudo 100% dos isolados analisados foram positivos por PCR para o gênero *Acanthamoeba*, isto se deve provavelmente a uma quantidade suficiente e à qualidade do DNA extraído para a realização deste trabalho a partir de culturas axênicas. Entretanto, para Mathers *et al.* (2000), a taxa de detecção de organismos de *Acanthamoeba* por PCR foi de 90% em suspensão celular contendo aproximadamente 1 a 5 organismos para cada 10 μ L, indicando uma sensibilidade próxima a um organismo.

4.5.2 Caracterização de isolados do gênero *Acanthamoeba* por RAPD

Para a caracterização molecular dos isolados de *Acanthamoeba* pela técnica de RAPD, inicialmente foram investigados os padrões de DNA resultantes da utilização de 10 oligonucleotídeos iniciadores a fim de selecionar os que gerassem um perfil monomórfico ou polimórfico para todos os isolados em estudo. Baseado no número, intensidade, reprodutibilidade

e potencial de discriminação dos produtos amplificados, quatro oligonucleotídeos iniciadores (OPC 05, OPC 06, OPC 09 e OPC 10) foram selecionados para as análises (Tabela 2).

A partir dos resultados das análises de RAPD com os quatro oligonucleotídeos iniciadores selecionados (Figuras 31 a 34), 100 fragmentos foram considerados e combinados para calcular uma matriz de similaridade genética pelo Coeficiente de Jaccard (APÊNDICE A). A partir da matriz de similaridade, um dendrograma (Figura 35) foi construído pelo Método da Ligação Média (“Average Linkage”) que utiliza a média da distância entre os isolados de cada grupo (APÊNDICE B).

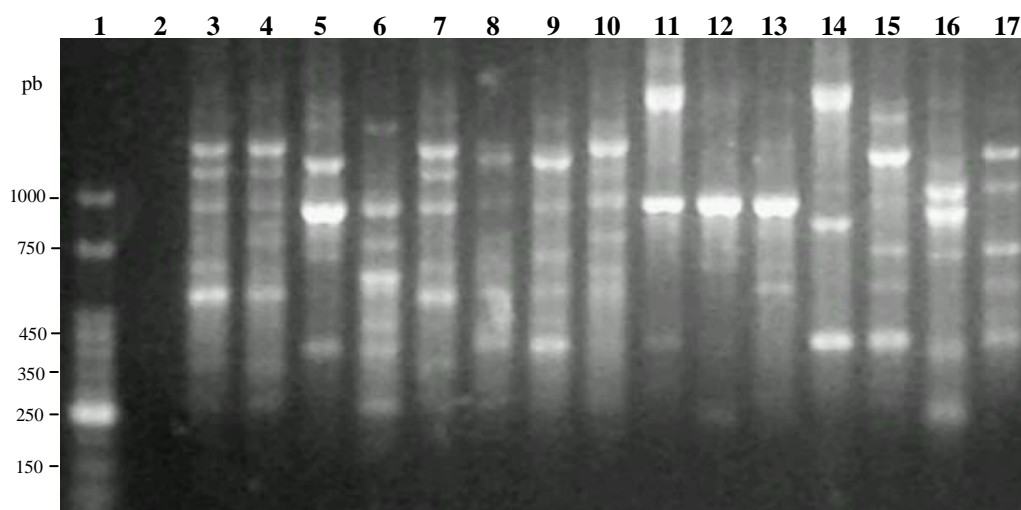


Figura 31 – Perfis de RAPD de 15 isolados de *Acanthamoeba* obtidos com o oligonucleotídeo iniciador OPC 05. (1) Marcador de peso molecular (50 bp), (2) Controle negativo, (3) *A. castellanii* Neff (ATCC 30010), (4) *A. castellanii* T4 (ATCC 50492), (5) PO1, (6) PTA1, (7) PTA2, (8) PTI2, (9) PTH2, (10) PTI3, (11) PI4, (12) PTO5, (13) PTI5; (14) PTI6; (15) PTM6, (16) PTI8, (17) P21.

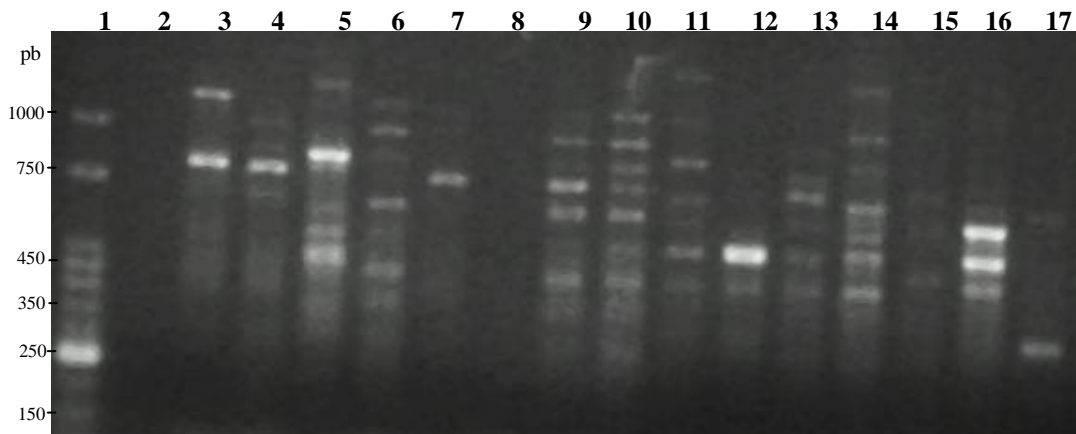


Figura 32 – Perfis de RAPD de 15 isolados de *Acanthamoeba* obtidos com o oligonucleotídeo iniciador OPC 06. (1) Marcador de peso molecular (50 bp), (2) Controle negativo, (3) *A. castellanii* Neff (ATCC 30010), (4) *A. castellanii* T4 (ATCC 50492), (5) PO1, (6) PTA1, (7) PTA2, (8) PTI2, (9) PTH2, (10) PTI3, (11) PI4, (12) PTO5, (13) PTI5; (14) PTI6; (15) PTM6, (16) PTI8, (17) P21.

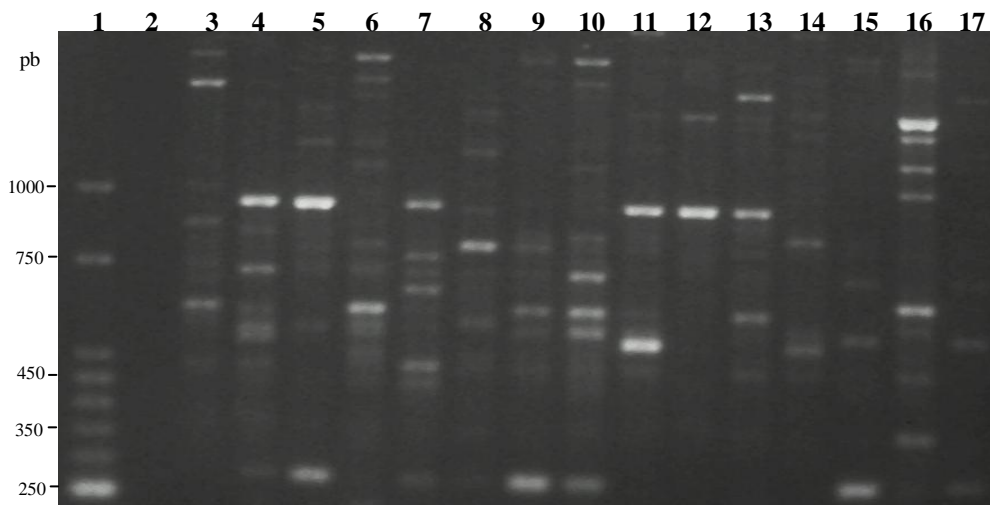


Figura 33 – Perfis de RAPD de 15 isolados de *Acanthamoeba* obtidos com o oligonucleotídeo iniciador OPC 09. (1) Marcador de peso molecular (50 bp), (2) Controle negativo, (3) *A. castellanii* Neff (ATCC 30010), (4) *A. castellanii* T4 (ATCC 50492), (5) PO1, (6) PTA1, (7) PTA2, (8) PTI2, (9) PTH2, (10) PTI3, (11) PI4, (12) PTO5, (13) PTI5; (14) PTI6; (15) PTM6, (16) PTI8, (17) P21.

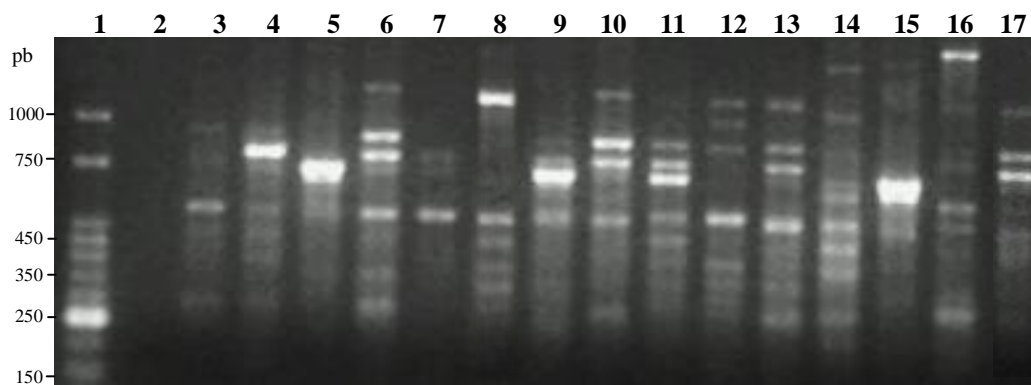


Figura 34 – Perfis de RAPD de 15 isolados de *Acanthamoeba* obtidos com o oligonucleotídeo iniciador OPC 10. (1) Marcador de peso molecular (50 bp), (2) Controle negativo, (3) *A. castellanii* Neff (ATCC 30010), (4) *A. castellanii* T4 (ATCC 50492), (5) PO1, (6) PTA1, (7) PTA2, (8) PTI2, (9) PTH2, (10) PTI3, (11) PI4, (12) PTO5, (13) PTI5; (14) PTI6; (15) PTM6, (16) PTI8, (17) P21.

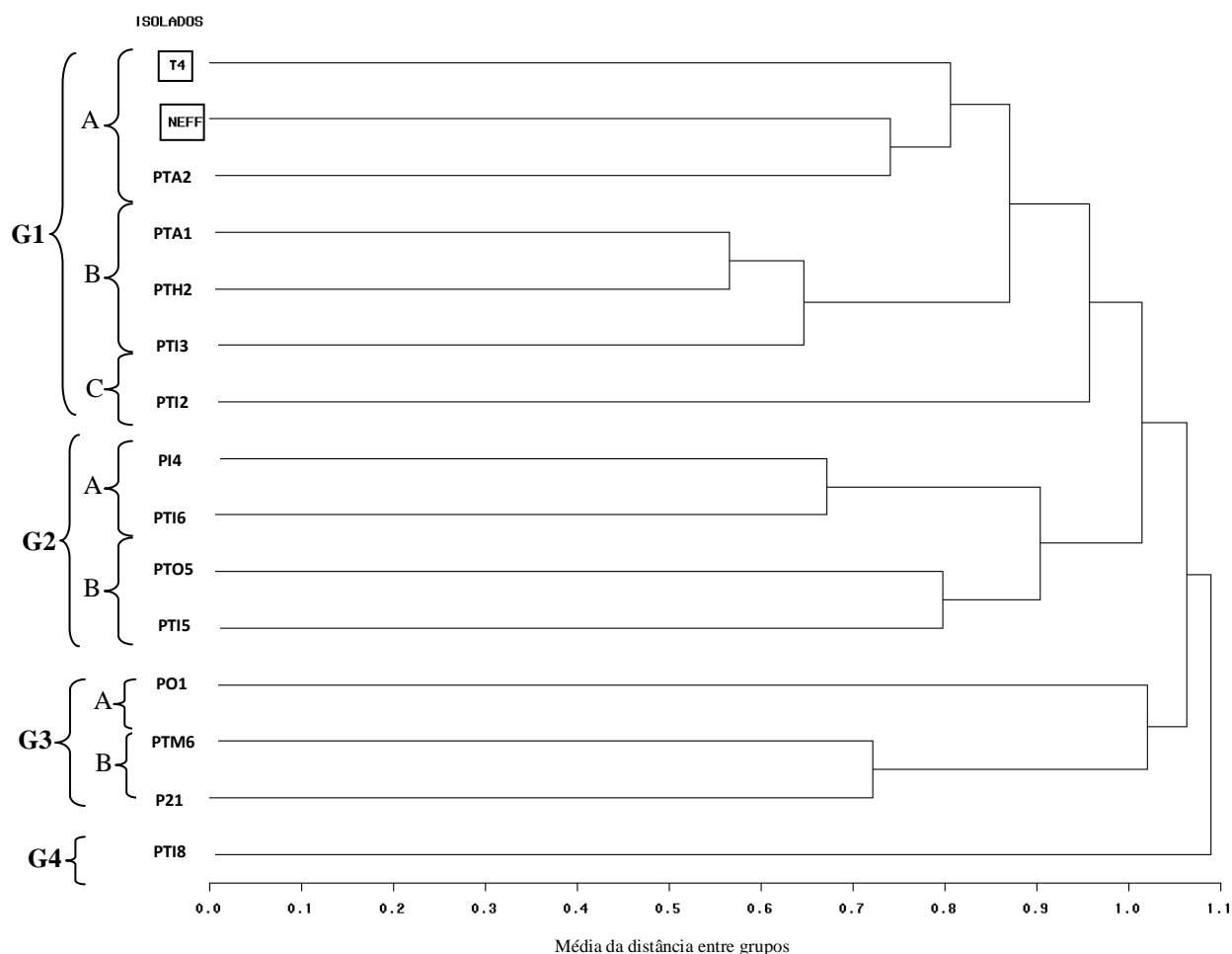


Figura 35 – Dendrograma obtido a partir dos valores de similaridade genética por RAPD utilizando o Coeficiente de Jaccard e a análise de agrupamento pelo Método de Ligação Média entre os isolados de piscinas do gênero *Acanthamoeba* e isolados de referência - *A. castellanii* Neff (ATCC 30010) e *A. castellanii* T4 (50492).

A comparação dos perfis de RAPD dos diferentes isolados permitiu estimar a similaridade genética entre eles, além de evidenciar o alto nível de variabilidade genética presente no gênero *Acanthamoeba*, conforme observado na literatura (STOTHARD *et al.*, 1998). Quatro grupos foram formados a partir da análise de agrupamento pelo método hierárquico de ligação média (“Average Linkage”). No primeiro grupo (G1), com similaridade máxima de 0,55263 estão os isolados de referência *A. castellanii* Neff (ATCC 30010), *A. castellanii* T4 (ATCC 50492) e os isolados PTA1, PTH2, PTI3, PTA2 e PTI2. O segundo grupo (G2), com similaridade máxima de 0,46875 reuniu os isolados PI4, PTI6, PTO5 e PTI5. O grupo três (G3), com similaridade máxima de 0,42857 reuniu os isolados PO1, PTM6 e P21 e no grupo quatro (G4) encontra-se o isolado PTI8 com similaridade máxima de 0,22500 e não agrupado aos outros isolados.

As características fenotípicas dos isolados por grupo morfológico (PUSSARD & PONS, 1977) (Tabela 4) e testes de tolerância, tais como, termotolerância e osmotolerância (KHAN *et al.*, 2001) (Tabela 5) foram utilizadas para corroborar os resultados obtidos a partir dos perfis de RAPD.

O G1 foi dividido em três subgrupos (A, B e C). No subgrupo A encontramos os isolados *A. castellanii* Neff (ATCC 30010), *A. castellanii* T4 (50492) e o PTA2. A similaridade máxima entre estes isolados foi de 0,41379. O isolado PTA2 encontra-se mais próximo ao isolado *A. castellanii* Neff (ATCC 30010) quando comparado a *A. castellanii* T4 (ATCC 50492) com similaridade de 0,37931. Observou-se que os isolados do subgrupo A foram classificados por critérios morfológicos como pertencentes ao grupo morfológico II, entretanto, nos testes de tolerância o isolado PTA2 apresentou comportamento semelhante ao isolado de referência *A. castellanii* Neff (ATCC 30010), não patogênico e talvez por isso encontram-se mais proximamente relacionados, de acordo com a similaridade dos padrões de amplificação. Sugere-se que o isolado PTA2 pertença à mesma espécie dos isolados de referência pelas características genotípicas e fenotípicas apresentadas.

No subgrupo B do G1 encontramos os isolados PTA1, PTH2 e PTI3 agrupados com similaridade máxima de 0,55262. Os isolados PTH2 e PTI3 foram classificados como pertencentes ao grupo morfológico III, enquanto o isolado PTA1 ao grupo morfológico II. Entretanto, conforme citado anteriormente, as características dos cistos são muito variáveis conforme o ambiente e as condições de cultura, o que poderá causar pleomorfismo e,

conseqüentemente, de determinação muito subjetiva. Conforme descrito por Walochnik *et al.* (2000) existe uma determinada dificuldade em diferenciar os grupos morfológicos II e III, devido a proximidade entre eles por apresentarem cistos com tamanhos inferiores a 18 µm. No grupo III, a morfologia dos cistos é descrita como arredondada e sem braços no endocisto, enquanto no grupo II encontram-se cisto que possuem de 4 a 7 braços, mas também cistos sem nenhum braço. Durante a identificação morfológica pode ter ocorrido uma superposição na classificação de cistos que não possuem braços do grupo II e os cistos do grupo III ou mesmo poderia haver mais de uma população de espécies de *Acanthamoeba* nos isolados. Quanto ao estudo da patogenicidade destes isolados, pelos testes de tolerância, PTH2 e PTI3 foram considerados isolados com baixo potencial patogênico, uma vez que, os dois apresentaram-se termotolerantes (cresceram a 42 °C) entretanto, não cresceram a 1 M de manitol, enquanto o isolado PTA1 considerado não-patogênico, não cresceu nas condições de 42 °C e 1 M de manitol.

O isolado PTI2 pertencente ao subgrupo C apresentou-se mais distante em relação aos outros isolados do G1, com similaridade máxima de 0,32432. Observou-se que no G1 os três isolados de piscinas do grupo morfológico III (PTI2, PTH2 e PTI3) apresentaram as mesmas características nos testes de tolerância. Os isolados PTI2, PTH2 e PTA2 foram obtidos de piscinas térmicas do mesmo clube, o que faz pensar que estes isolados possam ser clones, provavelmente originados de um mesmo organismo e carreados de uma piscina para a outra. Sugere-se que os isolados do G1 possam pertencer à espécie de *Acanthamoeba castellanii* por terem sido agrupados aos isolados de referência (ATCC 30010 e ATCC 50492) de acordo com os perfis de amplificação.

O G2 formado por quatro isolados, PTI6, PTO5 e PTI5 obtidos de água de piscinas térmicas e PI4 de piscina não-térmica foi dividido em dois subgrupos (A e B). No subgrupo A, encontram-se os isolados PI4 e PTI6, com similaridade de 0,46875, enquanto o subgrupo B, formado por PTO5 e PTI5 apresentou similaridade de 0,36842. Todos estes isolados foram classificados como pertencentes ao grupo morfológico II. Os isolados PI4 e PTI6, obtidos de clubes diferentes, além de apresentarem perfil genotípico semelhantes, também foram tolerantes a alta temperatura (42 °C) e alta osmolaridade (1 M de manitol) e considerados como potencialmente patogênicos, o que pode sugerir pertencerem à mesma espécie.

Já os isolados PTO5 e PTI5 obtidos de amostras de águas de piscinas térmicas do mesmo clube e classificados como grupo morfológico II, apresentaram características distintas quando avaliados pelos testes de tolerância. O isolado PTO5 foi considerado não-patogênico, pois não cresceu a temperatura de 42 °C e a 1 M de manitol, enquanto o isolado PTI5 cresceu nestas condições. Representantes de uma mesma espécie podem diferir entre si quanto a patogenicidade e vários fatores estão relacionados à virulência de isolados de *Acanthamoeba* (DE JONCKHEERE, 1980; WALOCHNIK *et al.*, 2000; KHAN, 2006; DA ROCHA-AZEVEDO & SILVA-FILHO, 2007). No caso do isolado PTI5, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados no presente estudo talvez não tenham se anelado às regiões responsáveis pela patogenicidade deste isolado, o que talvez pudesse diferenciá-lo de PTO5, ou ainda, as características fenotípicas de patogenicidade do isolado PTO5 poderiam ser inibidas por bactérias e vírus presentes no interior destas amebas. Sabe-se que bactérias no interior de amebas podem tornar-se mais virulentas, entretanto o resultado dessa interação em relação à patogenicidade das amebas ainda é desconhecido (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003; MOLMERET *et al.*, 2005). Para alguns eucariotos, como, por exemplo, o *Metharizium anisopliae*, a presença de vírus no seu interior, poderá alterar a sua patogenicidade (LEAL *et al.*, 1994). Wang & Nuss (1995) demonstraram a interferência de genes virais no fenótipo de um fungo fitopatogênico causando uma hipovirulência mediada pelo dsRNA viral.

Bactérias endossimbiontes e vírus, mesmo em culturas axênicas, podem ser encontrados em vários isolados de amebas. Esses organismos que sobrevivem no interior das amebas são, entre outros fatores, importantes por causa da influência que sua presença pode ter em estudos do DNA da *Acanthamoeba*. Alguns estudos demonstram que o DNA viral pode estar integrado ao genoma da ameba (BYERS, 1986; KHAN, 2006). Enterovírus podem ser encontrados em ambientes aquáticos e semelhantes à *Acanthamoeba* podem ser isolados de altas temperaturas (37 °C), como é o caso do vírus Coxsackie B (vírus de RNA), que depois da adesão na superfície da *Acanthamoeba*, e internalização de virions por trofozoítos, sobrevivem mantendo sua infectividade independente da dinâmica de replicação da ameba e encistamento (MATTANA *et al.*, 2006).

No G3 foram agrupados dois isolados de piscinas externas (PO1 e P21) e um isolado de piscina interna (PTM6), todos classificados como grupo morfológico II. Os isolados PTM6 e P21

foram agrupados com coeficiente de similaridade de 0,42857, enquanto o isolado PO1 apresentou uma similaridade máxima de 0,20690 em relação aos isolados PTM6 e P21. Os isolados PTM6 e PO1 foram classificados como potencialmente patogênicos, enquanto o isolado P21 considerado não patogênico. PO1 e P21 foram isolados do mesmo clube (piscinas externas) em períodos sazonais diferentes. Sugere-se que possam ser organismos originados de um mesmo clone e estejam presentes na água destas piscinas mesmo que em épocas diferentes.

O isolado PTI8 foi agrupado separadamente dos demais isolados no G4, pois apresentou um perfil genotípico completamente diferente dos demais pelas análises de RAPD. Este isolado foi classificado ao grupo morfológico III, entretanto diferente de todos os isolados do grupo morfológico III considerados no estudo, que foram classificados como isolados com baixo potencial patogênico por serem apenas termotolerantes (crescimento a 42 °C), o isolado PTI8 também apresentou baixo potencial patogênico, entretanto foi apenas osmotolerante (crescimento a 1 M de manitol).

Utilizando-se a técnica de RAPD foi possível relacionar o padrão de amplificação de alguns isolados com a origem das amostras. Observou-se que a maioria dos isolados obtidos de um mesmo clube, mas de piscinas diferentes, foram similares geneticamente, como os isolados PTA2, PTH2 e PTI2 (G1), PTO5 e PTI5 (G2), P21 e PO1 (G3), exceto os isolados PTI6 e PTM6 que apresentaram padrões de amplificação distintos e por isso apresentaram um coeficiente de similaridade de 0,08333 e ficaram em grupos separados.

Em contraste aos isolados do G1, que se agruparam aos isolados *A. castellanii* Neff (ATCC 30010) e *A. castellanii* T4 (ATCC 50492), os outros isolados de piscinas não puderam ser identificados ou agrupados com isolados de referência da ATCC, sugerindo que eles pertençam a outras espécies de *Acanthamoeba*. De acordo com Kong & Chung (1996), isolados de *Acanthamoeba* obtidos de diferentes fontes e em fase inicial de caracterização, podem ser analisados utilizando isolados de referência para confirmação de sua validade taxonômica.

Alguns estudos semelhantes de caracterização de isolados de *Acanthamoeba* baseados em análises de RAPD já foram realizados. Manaf *et al.* (2006) caracterizaram por RAPD isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba* obtidos a partir do cérebro, córnea, água de torneira e rios juntamente com os isolados de referência *A. castellanii* - CCAP 1501/2A, *A. polyphaga* - CCAP 1501/3A e *Hartmanella vermiformis* (CCAP 1534/7B). Os autores observaram uma grande

diversidade entre os isolados de *Acanthamoeba* e obtiveram a formação de três grupos, sendo um isolado clínico relacionado aos isolados de referência do gênero *Acanthamoeba*, e os outros isolados do gênero formando um grupo que reuniu todos os isolados obtidos da mesma fonte (rios) incluindo os isolados de água de torneira e córnea. O isolado *Hartmanella vermiformis* formou um subgrupo sozinho, não relacionado ao gênero *Acanthamoeba*.

Isolados de ceratite amebiana obtidos de casos humanos no Brasil, também foram submetidos a um estudo de caracterização por RAPD correlacionados as características morfológicas dos cistos. O método de RAPD evidenciou a alta variabilidade genética dos isolados do gênero *Acanthamoeba*, entretanto permitiu o agrupamento de alguns isolados mais proximamente relacionados, de acordo com a similaridade dos padrões de amplificação, especialmente entre os isolados brasileiros de úlcera de córnea. Os isolados obtidos da ATCC classificados, por critérios morfológicos, como espécies de grupos morfológicos diferentes (*A. castellanii*, *A. polyphaga*, pertencentes ao grupo morfológico II, e a *A. royreba*, pertencente ao grupo morfológico III) foram muito similares, enquanto quatro isolados, classificados com uma mesma espécie (*A. polyphaga*), apresentaram sempre padrões bastante distintos (ALVES *et al.*, 2000).

Ortega-Rivas *et al.* (2003, 2004 e 2005), aplicaram a técnica de RAPD para a diferenciação de espécies de *Acanthamoeba*. Seus dados demonstraram a habilidade das análises de RAPD em atribuir marcadores genéticos específicos para a identificação de isolados de *Acanthamoeba*. Os autores observaram padrões de bandas distintos e repetitivos para as espécies de *A. divionensis*, *A. polyphaga* e *A. astronyxis*. Os fragmentos característicos para cada espécie foram selecionados como possíveis marcadores espécie-específico, posteriormente purificados, testados por hibridização e seqüenciados. Um par de oligonucleotídeo específico para cada espécie foi desenhado e posteriormente testado para isolados clínicos e ambientais, demonstrando que o RAPD pode ser útil como uma ferramenta no diagnóstico de espécies de *Acanthamoeba*.

Im & Shin (2003), descreveram a identificação em nível de espécie de um isolado de *Acanthamoeba* obtido na Coréia a partir de um peixe de água doce. Baseados nas características morfológicas, bioquímicas e moleculares o isolado foi identificado como uma nova espécie. Entretanto não foi possível diferenciar o isolado em estudo pela técnica de RAPD. Os autores observaram a partir do dendrograma a formação de dois grupos pelos perfis de RAPD. Um grupo

formado por *A. hatchetti*, *A. triangularis* e três isolados coreanos incluindo o isolado em estudo e o outro formado pelos isolados *A. culbertsoni*, *A. polyphaga* e outro isolado coreano. Entretanto por PCR-RFLP, conseguiu-se diferenciar o isolado em estudo dos demais isolados de referência com base nas distâncias filogenéticas.

O método de RAPD também tem sido extensivamente usado para avaliar diferenças genéticas entre outros organismos da área de parasitologia. Dias Neto (1993) confirmou a utilidade da técnica de RAPD para a segregação e identificação de linhagens e espécies de parasitos do gênero *Schistosoma* sp. Também Singh (1997), afirmou que essa técnica permite análise da variação genética e a obtenção de identificadores de diversas linhagens de parasitas, como *Leishmania* sp., *Cryptosporidium* sp., tripanosomas e *Giardia* sp.

Para *Giardia lamblia*, Pelayo *et al.* (2003) utilizaram a técnica de RAPD com sucesso para demonstrar a correlação entre as características genéticas e o comportamento epidemiológico e clínico do protozoário, ou seja, distinguir características fenotípicas com uma ferramenta de Biologia Molecular. Isolados de *Entamoeba histolytica* do norte da Índia, foram caracterizados por RAPD e revelaram a presença de considerável polimorfismo genético entre si (PRAKASH *et al.*, 2004). Diferenças genotípicas entre isolados de *E. histolytica* foram também obtidas por RAPD a partir da análise do perfil eletroforético do gel e revelou alguns marcadores polimórficos que poderiam ser usados na caracterização individual dos isolados. Os resultados obtidos por RAPD permitiram a distinção dos isolados obtidos de pacientes sintomáticos e assintomáticos, além de correlacionar o polimorfismo exibido com a virulência dos mesmos (VALLE *et al.*, 2000).

A concordância entre os resultados obtidos por RAPD correlacionados às características fenotípicas permitiram o agrupamento e caracterização inicial dos isolados de *Acanthamoeba* de amostras de água de piscinas de clubes de Porto Alegre, RS. Os dados obtidos neste trabalho demonstram que a análise de RAPD pode atribuir marcas genéticas específicas para isolados indistinguíveis morfológicamente ou proximamente relacionados. Este método mostrou ser útil na caracterização dos isolados em estudo e provou ser um método rápido e informativo para a determinação da relação genética entre isolados diferentes.

5 CONCLUSÕES

AVL do gênero *Acanthamoeba* foram isoladas da água de piscinas de diversos clubes da cidade de Porto Alegre, RS.

O emprego das técnicas tradicionais permitiu o isolamento primário e o cultivo das amebas de vida livre isoladas. O sucesso na axenização dos isolados neste trabalho abre novas perspectivas para outros estudos como a análise de proteases, patogenicidade e estudo genético, sem a interferência de bactérias.

Os isolados foram identificados por sua morfologia e por PCR como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* e através da análise morfológica foram caracterizados como pertencentes a dois grupos taxonômicos II e III.

Os marcadores de patogenicidade utilizados para a caracterização inicial dos isolados através dos testes de osmotolerância e termotolerância, demonstraram a possível presença de isolados potencialmente patogênicos nas águas das piscinas analisadas.

A análise por PCR foi conclusiva. Os fragmentos amplificados apresentaram o tamanho esperado conforme o par de oligonucleotídeos iniciadores gênero-específico utilizados.

A técnica molecular de RAPD mostrou-se útil na caracterização genética dos isolados de *Acanthamoeba*, pois identificou um elevado grau de similaridade entre alguns isolados provenientes de diferentes clubes e piscinas e isolados de referência da ATCC e possibilitou a formação de quatro grupos conforme os perfis de amplificação. Os resultados obtidos por RAPD permitiram relacionar as variabilidades genotípicas com as fenotípicas.

As informações que foram geradas por este trabalho, poderão auxiliar em estudos posteriores para o entendimento sobre a epidemiologia ou a ecologia do gênero, determinação das espécies e genótipos mais comuns nos diferentes ambientes e quais isolados causam determinados tipos de patologias, ou ainda quais deles são mais comuns em diferentes tipos de ambientes, bem como no desenvolvimento de outros estudos para esclarecer questões referentes à identificação, mecanismos de patogenicidade e filogenia.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, R.D.; ORTEGA, Y.R., GILMAN, R.H.; STERLING, C.R. Intervening transcribed spacer region 1 variability in *Cyclospora cayetanensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 2339-2343, jun. 2000.

ADL, S.M. *et al.* The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 52, p. 399-451, oct. 2005.

AKSOZEK, A.; McCLELLAN, K.; HOWARD, K.; NIEDERKORN, J.Y.; ALIZADEH, H. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical and radiological conditions. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 88, p. 621-623, jun. 2002.

ALONSO, V.C. **Aplicación de RAPD para el diagnóstico y estudio molecular de *Leishmania brasiliensis***. Tesis Doctoral, 1999.

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, J.M.P.; GUSMÃO, C.X.; TEIXEIRA, M.M.G.; FREITAS, D.; FORONDA, A.S.; AFFONSO, H.T. Random amplified polymorphic DNA profiles as a tool for the characterization of Brazilian keratitis isolates of the genus *Acanthamoeba*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 33, p. 19-26, jan. 2000.

ANDERSON, W.R.; FAIRBANKS, D.J. Molecular markers: Important tools for plant genetics resource characterization. **Diversity**, Washington, v. 6, p. 51-53, 1990.

ARMSTRONG, M. The pathogenesis of human *Acanthamoeba* infection. **Infectious Disease Review**, Florida, v. 2, p. 65-73, 2000.

BALDWIN, B. G.; SANDERSON, M. J.; PORTER, J. M.; WOJCIECHOWSKI, M. F.; CAMPBELL, C. S.; DONOGHUE, M. J. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. **Annals Missouri Botanical Garden**, v. 82, p. 247-277, 1995.

BARBEAU, J.; BUHLER, T. Biofilmes augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. **Research in Microbiology**, Paris, v. 152, p. 753 - 760, oct. 2001.

BARKER, J.; BROWN, M.R. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. **Microbiology**, Reading, v. 140, p. 1253-1259, jun. 1994.

BERNANDER, S.; KALLING, S.I. Human parasites and amoeba: lower warm-water temperature is favourable to *Legionella* bacteria. **Lakartidningen**, Sweden, v. 95, p. 4340-4344, sep. 1998.

BOOTON, G.C.; KELLY, D.J.; CHU, Y-W.; SEAL, D.V.; HOUANG, E.; LAM, D.S.C.; BYERS, T.J.; FUERST, P.A. 18S ribosomal DNA typing and tracking of *Acanthamoeba* species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of *Acanthamoeba* keratitis patients in Hong Kong. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 1621-1625, may 2002.

BOOTON, G.C.; CARMICHAEL, J.R.; VISVESVARA, G.S.; BYERS, T.J.; FUERST, P.A. Genotyping of *Balamuthia mandrillaris* based on nuclear 18S and mitochondrial 16S rRNA genes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 68, p. 65-69, jan. 2003.

BOOTON, G.C.; ROGERSON, A.; BONILLA, T.D.; SEAL, D.V.; KELLY, D.J.; BEATTIE, T.K.; TOMLINSON, A.; LARES-VILLA, F.; FUERST, P.A.; BYERS, T.J. Molecular and physiological evaluation of subtropical environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. causal agent of *Acanthamoeba* keratitis. **The Journal Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 51, p. 192-200, mar-apr. 2004.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, Parkville, v. 43, p. 1689-1693, april 2005.

BRANDT, F.H.; WARE, D.A.; VISVESVARA, G.S.; Viability of *Acanthamoeba* cysts in ophthalmic solutions. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p. 1144-1146, May, 1989.

BYERS, T.J. Molecular biology of DNA in the genera *Acanthamoeba*, *Amoeba*, *Entamoeba*, and *Naegleria*. **International Review of Cytology**, New York, v. 99, p. 311-341, 1986.

BYRNE, K.A.; BURD, E.M.; et al. **Diagnostic microbiology and cytology of the eye**. Washington: Butterworth-Heinemann, 199 p., 1995.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, p. 9-78. 2006.

CAO, Z.; JEFFERSON, D.M.; PANJWANI, N. Role of carbohydrate-mediated adherence in cytopathogenic mechanisms of *Acanthamoeba*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, p.15838-15845, jun. 1998.

CASEY, S. P.; BAKKE, T. A.; HARRIS, P. D.; CABLE, J. Use of ITS rDNA for discrimination of European green- and brown-banded sporocysts within the genus *Leucochloridium carus*, 1835 (Digenea, Strigeidae). **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 56, p. 163-168, 2003.

CENGIZ, A.M.; HARMIS, N.; STAPLETON, F. Co-incubation of *Acanthamoeba castellanii* with strains of *Pseudomonas aeruginosa* alters the survival of amoeba. **Clinical & experimental ophthalmology**, Carlton, v. 28, p. 191-193, jun. 2000.

CHAPPELL, C.L.; JOHN, W.A.; RIGHT, C.M.; NEWSOME, A. L. Standardized method of measuring *Acanthamoeba* antibodies in sera from healthy human subjects. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 8, p. 724-730, jul. 2001.

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.

CIRILLO, J.D.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L.S. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, p. 3254-3261, aug. 1994.

COOK, G.C. Effect of global warming on the distribution of parasitic and other infectious diseases: a review. **Journal of the Royal Society of Medicine**, London, v. 85, p. 688-691, nov. 1992.

CORLISS, J. O. **Classification of protozoa and protists: the current status**. In: COOMBS, G. H.; VICKERMAN, K.; SLEIGH, M. A.; WARREN, A. Evolutionary relationships among protozoa. 3^a ed. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1998, p. 409 – 447.

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

CURSONS, R.T.M.; BROWN, T.J.; KEYS, E.A. Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae: in axenic condition. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, n. 40, p. 62-66, Jul. 1980.

DA ROCHA-AZEVEDO, B.; SILVA F.C. Biological characterization of a clinical and an environmental isolate of *Acanthamoeba polyphaga* : analysis of relevant parameters to decode pathogenicity. **Archives of microbiology**, Berlin, v. 188, p. 441-449, nov. 2007.

DE CARLI, G. A. **Parasitologia Clínica - Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas**. 2^a 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, apr, 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, aug-sep. 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 and Environmental Microbiology**, Washington, v. 39, p. 681-685, apr.1980.

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. Ecology of *Acanthamoeba*. **Reviews of infectious diseases**, Chicago, v. 13, p. 385-387, mar-apr. 1991.

DE JONCKHEERE, J.F. A century of research on the amoebaflagellate genus *Naegleria*. **Acta Protozoologica**, Warszawa, v. 41, p. 309-342. 2002.

DE JONCKHEERE, J. F. Epidemiological typing of *Acanthamoeba* strains isolated from keratitis cases in Belgium. **Societ Belge Ophthalmology**, Brussel, v. 28, n. 7, p. 27-33, 2003.

DIAS NETO, E; DE SOUZA, C.P.; ROLLINSON, D.; KATZ, N.; PENA, S.D.; SIMPSON, A.J. The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of *schistosoma*. **Molecular and biochemical parasitology**, Amsterdam, v. 57, p. 83-88, jan. 1993.

DUDLEY, R.; MATIN, A.; ALSAM, S.; SISSONS, J.; MAHSOOD, A.H.; KHAN, N.A. *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 but not T7 encyst in response to increased osmolarity and cysts do not bind to human corneal epithelial cells. **Acta Tropica**, London, v. 95, p. 100-108, aug. 2005.

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, jan. 2003.

FALCHI, Ricardo Luiz Ricci. **Contaminação por protozoários potencialmente patogênicos ao homem na água de diferentes pontos da Laguna dos Patos, Rio Grande, RS**. Pelotas, 2006.

93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências – área de conhecimento: Parasitologia). Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas.

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

FERRANTE, A. Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. **Parasite Immunology**, London, v.13, p. 31-47, jan. 1991.

FORONDA A.S. **Tratado de infectología**. São Paulo, Atheneu, 1996, v. 2, p. 1160-1166.

GARATE, M.; MARCHANT, J.; CUBILLOS, I.; CAO, Z.; KHAN, N.A.; PANJWANI, N. *In Vitro* Pathogenicity of *Acanthamoeba* is associated with the expression of the mannose-binding protein. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Boston, v. 47, n. 3, p. 1056–1062, mar. 2006.

GARCIA, L.S.; BRÜCKNER, D.A. **Diagnostic Medical Parasitology**. 3. ed., Washington, 1997, 937 p.

GAST, R. J.; LEDEE, D.R.; FUERST, P.A.; BYERS, T.J. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. **The Journal of eukaryotic microbiology**, Laurence, v. 43, p. 498-504, may 1996.

GAST, R.J. Development of *Acanthamoeba*- specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Laurence, v. 48, n. 6, p. 609 – 615, nov-dec. 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, feb. 2009.

GIAZZI JF. **Contribuição para o estudo do isolamento, cultivo e manutenção das amebas de vida livre** [Tese de livre-docência]. Araraquara, 1996. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP.

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.

GRAY, T.B.; CURSONS, R.T. M.; SHERWAN, J.F.; ROSE, P.R. *Acanthamoeba*, bacterial, and fungal contamination of contact lens storage cases. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 79, p. 601-605, jun. 1995.

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

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

HE, Y.; JERRY, Y.; NIEDERKORN, J.Y.; MCCULLEY, G.L.; STEWART, D.R.; MEYER, R.S.; DOUGHERTY, J. In vivo and in vitro collagenolytic activity of *Acanthamoeba castellanii*. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Dallas, v. 31, p. 2235-2240, nov. 1990.

HONG, Y.C.; KONG, H.H.; OCK, M.S.; KIM, I.S.; CHUNG, D.I. Isolation and characterization of a cDNA encoding a subtilisin-like serine proteinase (AhSUB) from *Acanthamoeba healyi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 111, p. 441-446, dec. 2000.

HOWE, D.K.; VODKIN, M.H.; NOVAK, R.J.; VISVESVARA, G.S.; MCLAUGHLIN, G.L. Identification of two genetic markers that distinguish pathogenic and nonpathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. **Parasitology Research**, Berlin, v. 83, p. 345-348, 1997.

HUSTON, C.D. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. **Trends in Parasitology**, Dallas, v. 20, p. 23-26, jan. 2004.

HUYSE, T.; VOLCKAERT, F.A.M. Identification of a host-associated species complex using molecular and morphometric analyses, with the description of *Gyrodactylus rugiensoides* n. sp.

(Gyrodactylidae, Monogeneae). **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 32, p. 907-919, 2002.

ILLINGWORTH, C.D., COOK, S.D. *Acanthamoeba* Keratitis. **Survey of Ophthalmology**, Brookline, v. 42, p. 493-508, may-jun.1998.

IM, K.I.; SHIN, H.J. *Acanthamoeba sohi*, n. sp., a pathogenic Korean isolate YM-4 from a freshwater fish. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 41, p. 181-188, dec. 2003.

JOHN, D.T.; JOHN, R.A. Viability of pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* and virulence of *n. fowleri* during long-term cryopreservation. **Folia parasitologica**, Czech Republic, v. 43, p. 43-46, 1996.

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, jul, 1975.

KHAN, N.A.; JARROL, E.L.; PANJWANI, N.; CAO, Z.; PAGET, T.A. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and non-pathogenic species of *Acanthamoeba*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 2858-286, aug. 2000.

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.

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, sep. 2002.

KHAN, N.A. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 34, p. 277-285, jun. 2003.

KHAN, N.A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiology Review**, London, v.30, p. 564-595, May 2006.

KILIC, A.; TANYUKSEL, M.; SISSONS, J.; JAYASEKERA, S.; KHAN, N.A. Isolation of *Acanthamoeba* isolates belonging to T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental samples in Ankara, Turkey. **Acta Parasitology**, Poland, v. 49, p. 246-252, 2004.

KILVINGTON, S. Moist-heat disinfection of *Acanthamoeba* cysts. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 13, p. 418, mar-apr. 1991.

KILVINGTON, S.; BEECHING, J. Development of a PCR for identification of *Naegleria fowleri* from the environment. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 3764-3767, oct. 1995.

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, jan. 2004.

KINGSTON, D.; WARHURST, D.C. Isolation of amoebae from the eye. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 2, p. 27-36, 1969.

KODET, R.; NOHYNKOVA, E.; TICHY, M.; SOUKUP, J.; VISVESVARA, G. Amebic encephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris* a Czech child: description of the first case from Europe. **Pathology Research and Practice**, Stuttgart, v. 194, p. 2423-2429, 1998.

KONG, H.H.; CHUNG, D.I. PCR and RFLP variation of conserved region of small subunit ribosomal DNA among *Acanthamoeba* isolates assigned to either *A.castellanii* or *A. polyphaga*. **The Korean journal of parasitology**, Seoul, v. 34, p. 127-134, jun. 1996.

LEAL, S.C.M.; BERTIOLI, D.J.; BALL, B.V.; BUTT, T.M. Presence of double-stranded RNAs and virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, London, v. 4, p. 89-94, 1994.

LEDEE, D.R.; SEAL, D.V.; BYERS, T.J. Confirmatory evidence from 18S rRNA gene analysis for in vivo development of propamidine resistance in a temporal series of *Acanthamoeba* ocular isolates from a patient. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 42, p. 2144-2145, aug. 1998.

LEHMANN, O.J.; GREEN, S.M.; MORLET, N.; KILVINGTON, S.; KEYS, M. F.; MATHESON, M.M.; DART, J.K.; MCGILL, J.I.; WATT, P.J. Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Brookline, v. 39, p. 1261-1265, jun 1998.

LIU, H.; HA, Y.R.; LEE, S.T.; HONG, Y.C.; KONG, H.H.; CHUNG, D.I. Genetic diversity of *Acanthamoeba* isolated from ocean sediments. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 44, n. 2, p. 117-125, jun. 2006.

LLOYD, D.; MELLOR, H.; WILLIAMS, J.L. Oxygen affinity of the respiratory chain of *Acanthamoeba castellanii*. **Biochemical Journal**, London, v. 214, p. 47-51, mar. 1983.

LORENZO-MORALES, J.; MONTEVERDE-MIRANDA, C.A.; JIMÉNEZ, C.; TEJEDOR, M.L.; VALLADARES, B.; ORTEGA-RIVAS, A. Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Lublin, v. 12, p. 233-236, 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. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Abingdon Carfax, v. 99, p. 751-758, dec. 2005b.

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, mar. 2005c.

LORENZO-MORALES, J.; ORTEGA-RIVAS, A.; MARTÍNEZ, E.; KHOUBBANE, M.; ARTIGAS, P.; PERIAGO, M.V.; FORONDA, P.; ABREU-ACOSTA, N.; VALLADARES, B.; MAS-COMA, S. *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental freshwater samples in the Nile Delta region, Egypt. **Acta tropica**, Netherlands, v. 100, p. 63-69, nov. 2006.

MA, P.; VISVESVARA, G.S.; MARTINEZ, A.J.; THEODORE, F.H.; DAGGET, P.M.; SAWYER, T.K. *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections: review. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 12, p. 490-513, may-jun. 1990.

MAGHSOOD, A.H.; SISSONS, J.; REZAIAN, M.; NOLDER, D.; WARHURST, D.; KHAN, NA. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. **Journal of medical microbiology**, Edinburgh, v. 54, p. 755-759, aug. 2005.

MANAF, S.R.A.; MUSTAFA, S.; NAKISAH, A.M.; ABDUL, M.A. Genetic relatedness among isolates of *Acanthamoeba* based on RAPD Analysis. **Journal of Applied Sciences**, v. 6, p. 15-19, 2006.

MARCIANO-CABRAL, F.; PUFFENBARGER, R.; CABRAL, G.A. The increasing importance of *Acanthamoeba* infections. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Laurence, v. 47, p. 29-36, jan-feb. 2000.

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

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

MATHERS, W.; SCOTT, N.E.; LANE, J.L.; WILSON, M.; ALLEN, R.C.; FOLBERG, R. Confirmation of Confocal Microscopy Diagnosis of *Acanthamoeba* Keratitis Using Polymerase Chain Reaction Analysis. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 118, p. 178-183, feb. 2000.

MATTANA, A.; SERRA, C.; MARIOTTI, E.; DELOGU, G.; FIORI, P.L.; CAPPUCCINELLI, P. *Acanthamoeba castellanii* promotion of in vitro survival and transmission of coxsackie b3 viruses. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 5, p. 665-671, apr. 2006.

MAZUR, T.; HADAS, E.; IWANICKA, I. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. **Tropical Medicine Parasitology**, Stuttgart, v. 46, p. 106-108, jun. 1995.

MCLAUGHLIN, G.L.; VODKIN, M.N.; HUIZINGA, H.W. Amplification of repetitive DNA for the specific detection of *Naegleria fowleri*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, p. 227-230, feb. 1991.

MOLMERET, M.; HORN, M.; WAGNER, M.; SANTIC, M.; KWAIK, Y.A. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 20-28, jan. 2005.

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

MUNOZ, V.; REYES, H.; TOCHE, P.; CÁRCAMO, C.; GOTTLIEB, B. Isolation of free living amoebae from public swimming pool in Santiago, Chile. **Parasitología Latinoamericana**, Santiago, v. 58, p. 106-111, jul. 2003.

MYERS, L.E.; SILVA, S.V.; PROCUNIER, J.D.; LITTLE, P.B. Genomic fingerprinting of *Haemophilus somnus* isolates by using a random-amplified polymorphic DNA assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Parkville, v. 31, p. 512-517, mar. 1993.

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, dec. 1974.

NOSÉ, W.; SATO, E.H.; FREITAS, D.; RIBEIRO, M.P.; FORONDA, A.S.; KWITTKO, S. *et al.* Úlcera de córnea por *Acanthamoeba*: quatro primeiros casos de Brasil. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 51, p. 223-226, set. 1988.

NOYES, H.A.; BELLI, A.A.; MAINGON, R. Appraisal of various random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction primers for *Leishmania* identification. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 55, p. 98-105, jul. 1996.

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, nov-dec. 2003.

ODOM, A., DEL-POETA, M., PERFECT, J., HEITMAN, J. The immunosuppressant FK506 and its nonimmunosuppressive analog L-685,818 are toxic to *Cryptococcus neoformans* by inhibition of a common target protein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 41, p. 156–161, jan. 1997.

ORTEGA-RIVAS, A.; LORENZO-MORALES, J.; ALONSO, V.; ABREU, N.; FORONDA, P.; DEL CASTILLO, A.; VALLADARES, B. Random amplified polymorphic DNA profiles as a tool for the identification of *Acanthamoeba divionensis*. **Current microbiology**, New York, v. 47, p. 84-86, aug. 2003.

ORTEGA-RIVAS A.; LORENZO-MORALES, J.; MARTINEZ, E.; VILLA, M.; VALLADARES, B.; DEL CASTILLO, A. Design and evaluation of a specific primer pair for the diagnosis and identification of *Acanthamoeba polyphaga*. **Current microbiology**, New York, v. 48, p. 360-3, may 2004.

ORTEGA-RIVAS, A.; LORENZO-MORALES, J.; MARTÍNEZ, E.; VILLA, M.; CLAVEL, A.; VALLADARES, B.; DEL CASTILLO, A. A specific primer pair for the diagnosis and identification of *Acanthamoeba astronyxis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. **The Journal of parasitology**, Lawrence, v. 91, p. 122-6, feb. 2005.

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, nov. 1967.

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

PARIJA, S. C., PRAKASH M.R., RAO, V.A.; VELLANIPARAMBIL, R.J. *Acanthamoeba* keratitis in Pondicherry. **Journal of Communicable Diseases**, Delhi, v. 33, p. 126–129. 2001.

PATZ, J.A.; GRACZYK, T.K.; GELLER, N.; VITTOR, A.Y. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, p. 1395-1405, nov. 2000.

PELAYO, L. et al. Genes characterization by random amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) OF 18 isolates of *Giardia lamblia* obtained from day care children. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 104, p. 162-166, Jul-aug. 2003.

PENS, C.; COSTA, M.; FADANELLI, C.; CAUMO, K.; ROTT, M. B. *Acanthamoeba* spp. and bacterial contamination in contact-lens storage cases and the relationship to user profiles. *Parasitology Research*, Berlin, v. 103, p.1241-1245, nov. 2008.

PRAKASH, A.; CHAKRABORTI, A.; MAHAJAN, R.C.; GANGULY, N.K. DNA polymorphism in North Indian isolates of *Entamoeba histolytica* detected by PCR fingerprinting. *Parasitology Research*, Berlin, v. 88, p. 126-129, feb. 2004.

PRESTON, T.M.; KING, C.A. Amoeboid locomotion of *Acanthamoeba castellanii* with special reference to cell-substratum interactions. *Journal of General Microbiology*, London, v. 130, p. 2317-2323, sep. 1984.

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

QVARNSTROM, Y.; VISVESVARA, G.S.; SRIRAM, R.; SILVA, A.J. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *Journal of Clinical Microbiology*, Parkville, v. 44, p. 3589-95, oct. 2006.

RADFORD, C.; LEHMAN, O.; DART, J.K.G. *Acanthamoeba* keratitis: multicentre survey in England 1992-6. *The British journal of ophthalmology*, London, v. 82, p. 1387-1392, dec. 1998.

RADFORD, C. F.; MINASSIAN, D. C.; DART, J. K. G. *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. *British Journal of Ophthalmology*, London, v. 86, p. 536–542, may 2002.

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, jul. 1993.

RODRÍGUEZ-ZARAGOZA, S. Ecology of free-living amoebae. *Critical Reviews in Microbiology*, Boca Raton, v. 20, n. 3, p. 225-241,1994.

ROHR, U.; WEBER, S.; MICHEL, R.; SELENKA, F. WILHELM, M. Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 1822-1824, May, 1998.

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, dec. 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, nov. 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, oct. 1982.

SAULNIER, P.; BOURNEIX, C.; PREVOST, G.; ANDREMONT, A. Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Parkville, v. 31, p. 982-985, apr. 1993.

SCHMITZ-ESSER, S.; TOENSHOFF, E.R.; HAIDER, S.; HEINZ, E.; HOENNINGER, V.M.; WAGNER, M.; HORN, M. Diversity of bacterial endosymbionts of environmental *acanthamoeba* isolates. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 5822-5831, sep. 2008.

SCHÖNIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCH, C.; SCHALLIG, D.; PESBER, W.; JAFFE, C. L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, New York, v. 47, p. 349-358, 2001.

SCHROEDER, J.M.; BOOTON, G.C.; HAY, J.; NISZL, I.A.; SEAL, D.V.; MARKUS, M.B.; FUERST, P.A.; BYERS, T.J. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 1903-1911, may 2001.

SCHUSTER, F.L. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, p. 342-354, jul. 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, Aug. 2004a.

SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 126, p. 91-120, dez. 2004b.

SEAL, D.V.; BEATTIE, T.K.; TOMLINSON, A.; FAN, D.; WONG, E. *Acanthamoeba* keratitis. **The British journal of ophthalmology**, London, v. 87, p. 516-517, apr. 2003.

SELL, J.J.; RUPP, F.W.; ORRISON, W.W. Jr. Granulomatous amebic encephalitis caused by *Acanthamoeba*. **Neuroradiology**, Berlin, v. 39, p. 434-436, 1997.

SHARMA, S.; GARG, P.; RAO, G.N. Patient characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis. **The British journal of ophthalmology**, London, v. 84, p. 1103-1108, oct. 2000.

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

SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, Sydney, v. 27, n. 10, p. 1135-1145, oct. 1997.

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, jan-fev. 1998.

THOMAS, V.; HERRERA-RIMANN, K.; BLANC, D. S.; GREUB, G. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 2428-2438, apr. 2006.

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, Mar. 2004.

TURNER, N.A.; HARRIS, A. D.; LLOYD, D. Observation microbial differentiation an changes in susceptibility to antimicrobial agents. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, p. 751, nov. 2000.

TURNER, N.A.; BIAGINI, G.A.; LLOYD, D. Anaerobiosis-induced differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. **FEMS Microbiology Letters**, London , v. 157, p. 149-153, jan. 2006.

VALLE, P.R.; *et al.* Impressões digitais de DNA e RNA através de AP-PCR em *Entamoeba histolytica*. **Revista do Intituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 42, p. 249-253, oct. 2000.

VESALUOMA, M.; KALSO, S.; JOKIPII, L.; WARHURST, D.; PÖNKÄ, A.; TERVO, T. Microbiological quality in Finnish public swimming pools and whirlpools with special reference to free living amoebae: a risk factor for contact lens wearers? **The British journal of ophthalmology**, London, v. 79, p. 178-181, feb. 1995.

VISVESVARA, G.S. **Free-living pathogenic amoebae. Manual of Clinical Microbiology**, 3. ed. Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Truant JP, editors. Washington DC: America Society for Microbiology, p.704-708, 1980.

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

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

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

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

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. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St. Louis, v. 45, p. 1418-1426, may 2004.

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, oct. 2000.

WANG, P.; NUSS, D.L. Induction of a *Cryphonectria parasitica* cellobiohydrolase I gene is suppressed by hypovirus infection and regulated by a GTP-binding-protein-linked signaling pathway involved in fungal pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, p. 11529-11533, dec. 1995.

WELSH, R.J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, p. 7213-7218, dec. 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; KENNETH, J.L. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, p. 6231-635, nov. 1990.

ZETTLER, L.A.A.; NERAD, T.A.; O'KELLY, C.J.; PEGLAR, M.T.; SILBERMAN, J.D. *et al.* A molecular reassessment of the Leptomyxid amoebae. **Protistology**, Omsk, v. 151, p. 275-282, oct. 2000.

7 APÊNDICES

APÊNDICE A – Matriz do coeficiente de similaridade de Jaccard obtido entre os isolados de *Acanthamoeba* nas análises de RAPD.

ISOLADOS	T4	NEFF	PO1	PA1	PA2	PI2	PH2	PI3	PI4	PO5	PT5	PI6	PM6	PI8	P7
T4	1,00000														
NEFF	0,34483	1,00000													
PO1	0,05556	0,18182	1,00000												
PTA1	0,28205	0,27500	0,25000	1,00000											
PTA2	0,37931	0,41379	0,14286	0,20930	1,00000										
PTI2	0,18182	0,21212	0,18182	0,15909	0,32258	1,00000									
PTH2	0,34286	0,37143	0,30556	0,55263	0,32432	0,33333	1,00000								
PTI3	0,30000	0,39474	0,15556	0,45455	0,31707	0,26190	0,52500	1,00000							
PI4	0,22857	0,18919	0,16216	0,25000	0,21622	0,22222	0,26829	0,23913	1,00000						
PTO5	0,08000	0,16667	0,17391	0,18182	0,16000	0,16667	0,20000	0,17143	0,28000	1,00000					
PTI5	0,32143	0,26667	0,19355	0,32432	0,30000	0,18750	0,35294	0,24390	0,44828	0,36842	1,00000				
PTI6	0,10526	0,10256	0,13514	0,14894	0,10000	0,13158	0,15909	0,12000	0,46875	0,19231	0,24242	1,00000			
PTM6	0,12903	0,24138	0,20690	0,17500	0,19355	0,20000	0,33333	0,19512	0,08108	0,09091	0,13333	0,08333	1,00000		
PTI8	0,15789	0,09756	0,07317	0,16667	0,06977	0,15385	0,15217	0,20833	0,22500	0,17857	0,19444	0,14286	0,07895	1,00000	
P21	0,06452	0,13333	0,17857	0,15385	0,16667	0,21429	0,20000	0,14634	0,11765	0,04762	0,14286	0,12121	0,42857	0,05405	1,00000

APÊNDICE B – Método da Ligação Média (Average Linkage)

Análise de Agrupamento – Média de ligação entre os grupos analisados

Nº do Cluster	Isolados agrupados		Distância
14	PTA1	PTH2	0,5651
13	CL14	PTI3	0,6461
12	PI4	PTI6	0,6711
11	PTM6	P21	0,7218
10	NEFF ^a	PTA2	0,7405
9	PTO5	PTI5	0,7978
8	T4 ^b	CL10	0,8061
7	CL8	CL13	0,8703
6	CL12	CL9	0,9041
5	CL7	PTI2	0,9572
4	CL5	CL6	1,0144
3	PTO1	CL11	1,0199
2	CL4	CL3	1,0633
1	CL2	PTI8	1,089

Neff^a- *A. castellanii* Neff (ATCC 30010) T4^b- *A. castellanii* T4 (ATCC 50492)

8 ANEXOS

ANEXO A - Meios de cultura e soluções utilizadas

8.1 Solução Salina de Page

120 mg de cloreto de sódio (NaCl)

4 mg de sulfato de Magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)

142 mg de hidrogenofosfato dissódico anidro (Na_2HPO_4)

136 mg de diidrogenofosfato de Potássio (KH_2PO_4)

4 mg de cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Água destilada q.s.p 1000 mL

Preparo: Todos os componentes forma dissolvidos na ordem apresentada, com exceção do CaCl_2 que foi dissolvido separadamente a adicionado posterior ao resfriamento da solução. O pH foi ajustado em $6,5 \pm 0,2$ e a solução esterilizada por autoclavagem (121°C por 15 min).

8.2 Ágar não-nutriente (ANN)

100 mL de solução salina de Page (1X)

1,5g de ágar

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

8.3 Meio Proteose Peptona Extrato de Levedo e Glicose (PYG) pH $6,5 \pm 0,2$

7,5g de Proteose Peptona
0,75g de Extrato de levedo
0,98g de Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
0,059g 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 (KH_2PO_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 CaCl_2 que foi dissolvido separadamente e adicionado posterior ao resfriamento da solução. O pH foi ajustado em $6,5 \pm 0,2$ e a solução esterilizada por autoclavagem (121°C por 15 min).

8.4 Fixador de Schaudinn modificado (Bruckner, 1993)

8.4.1 Solução de sulfato de cobre:

20g de sulfato de cobre II $5\text{H}_2\text{O}$
Água destilada q.s.p. 1000 mL

8.4.2 Solução estoque

600 mL de solução de sulfato de cobre II
30 mL de Álcool etílico a 95%
15 mL de Glicerina

8.4.3 Solução fixadora:

100 mL de Solução estoque

5 mL de Ácido acético glacial

Observação: O ácido acético foi adicionado imediatamente antes do uso.

8.4.4 Coloração de tricrômico de Wheatley modificada por Gomori (Bruckner, 1993).

0,6 g de Cromotropro 2R

0,3 g de “Light Green” SF

0,7g de ácido fosfotúngstico

1 mL de ácido acético glacial

100 mL de água destilada

Depois de fixadas as lâminas foram tratadas como segue:

- Álcool 70% durante 5 min
- Álcool 70% iodado 1min
- Álcool 70% 5min
- Álcool 70% 3 min
- Tricrômico 13 min
- Álcool 90% acidificado de 1 a 3 segundos
- Álcool 100% para limpar
- Álcool 100% em duas cubas 3 min cada
- Xileno durante 10 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: “Caracterização de isolados de *Acanthamoeba* em piscinas de Porto Alegre, RS”.

Laboratório de Parasitologia

Departamento de Microbiologia

Aluna: Karin Silva Caumo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. 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 piscinas 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 piscinas do presente 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