

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

**IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS ATRAVÉS DA COCULTURA E
ENRIQUECIMENTO AMEBIANOS**

JÚLIA ANDRESSA PAES DOS SANTOS

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

Porto Alegre
agosto/2018

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

**IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS ATRAVÉS DA COCULTURA E
ENRIQUECIMENTO AMEBIANOS**

Júlia Andressa Paes dos Santos
Graduada em Ciências Biológicas

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia do
Ambiente

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

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil
agosto/2018

CIP - Catalogação na Publicação

dos Santos, Júlia Andressa Paes
Identificação de micro-organismos através da
cocultura e enriquecimento amebianos / Júlia Andressa
Paes dos Santos. -- 2018.
64 f.
Orientadora: Marilise Brittes Rott.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Cocultura amebiana. 2. Enriquecimento amebiano.
3. Amebas de vida livre. I. Rott, Marilise Brittes,
orient. II. Título.

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

“Vivo porque encisto”

Acanthamoeba

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram nesse período de desenvolvimento do meu trabalho, contribuindo para meu crescimento profissional e pessoal, especialmente:

Ao Guilherme Krüger Araujo, meu noivo, meu parceiro, meu amor, pelo incentivo, conselhos e por me ajudar a me manter firme nos momentos ruins e, principalmente, obrigada por me aguentar durante esse período! Te amo!

À minha orientadora Marilise Brittes Rott pela paciência, auxílio, incentivo e pelo conhecimento compartilhado.

A todos os colegas do Grupo AVL e do setor de Parasitologia, pela companhia e auxílio, seja na bancada, nos momentos de descontração na hora do café ou emprestando os ouvidos nos momentos difíceis.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa.

IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS ATRAVÉS DA COCULTURA E ENRIQUECIMENTO AMEBIANOS

Autor: Júlia Andressa Paes dos Santos
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marilise Brittes Rott

RESUMO

Amebas de vida livre (AVL) podem ser encontradas em diferentes ambientes, onde se alimentam de diversos micro-organismos. Algumas bactérias, vírus e fungos predados por AVL são chamados de micro-organismos resistentes a amebas (MRA), pois resistem à fusão lisossomal e são capazes de se multiplicar e se evadir das AVL após a internalização. As amebas podem ser ferramentas para a identificação desses micro-organismos intracelulares, como também ser utilizadas para estudos de virulência, patogenicidade e interação micro-organismo-hospedeiro. O objetivo do trabalho foi utilizar dois métodos de identificação de micro-organismos ambientais, denominados cocultura e enriquecimento amebiano, além de aplicar a culturômica, para identificar AVL e MRA em amostras de água de origem antropogênica externa e nosocomial. Utilizando a cocultura amebiana e a culturômica, foram identificados 17 gêneros diferentes, incluindo *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Candida* spp. e a bactéria fastidiosa *Bosea vestrisii*. Das amostras positivas para AVL, utilizando o enriquecimento amebiano, foram identificadas *Acanthamoeba* spp. (90,9%), *Vermamoeba vermiformis* (54,5%) e *Naegleria* spp. (45,4%).

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. (52 p.) agosto, 2018.

IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS BY AMOEBAL COCULTURE AND AMOEBAL ENRICHMENT METHODS¹

Author: Júlia Andressa Paes dos Santos

Advisor: Prof. Dr. Marilise Brittes Rott

ABSTRACT

Free living amoebae (FLA) can be found in different environments, where they feed on diverse microorganisms. Some bacteria, viruses and fungi preyed by FLA are called amoeba-resistant microorganisms (ARM), as they resist to lysosomal fusion and are capable of multiplying and evading FLA after internalization. Research show that amoebae can be tools for intracellular microorganisms identification, as well as for research of virulence, pathogenicity and microorganism-host interaction. The aim of this work was to apply two methods for identification of environmental microorganisms, called amoebal coculture and amoebal enrichment, as well applying culturomics to identify FLA and ARMs in water samples of external anthropogenic and nosocomial environment. Seventeen different microorganisms genera have been identified through amoebic coculture and culturomics, including *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Candida* spp. and the fastidious bacteria *Bosea vestrisii*. Of the positive samples for FLA, through amoebal enrichment, *Acanthamoeba* spp. (90,9%), *Vermamoeba vermiformis* (54,5%) and *Naegleria* spp. (45,4%) were identified.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (52 p.) agosto, 2018.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	2
2.1	Objetivo Geral	2
2.2	Objetivos Específicos	2
3.	REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1	Amebas de vida livre	3
3.2	Amebas de vida livre como fontes de micro-organismos	3
3.3	Bactérias Resistentes a Amebas	5
3.4	Enriquecimento e Cocultura Amebiana	6
3.5	Culturômica	7
3.6	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass-Spectrometry</i> (MALDI-TOF MS)	9
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	10
4.1	Local de desenvolvimento do projeto	10
4.2	Coletas	10
4.3	Processamento das amostras	11
4.3.1	Enriquecimento amebiano	12
4.3.1.1	Teste de exflagelação	15
4.3.2	Cocultura amebiana	15
4.3.3	Culturômica	20
5.	RESULTADOS	22
5.1	Enriquecimento amebiano	22
5.1.1	Teste de exflagelação	23
5.2	Cocultura amebiana	23
5.3	Culturômica	26
6.	DISCUSSÃO	28
7.	CONCLUSÃO	40
8.	PERPECTIVAS FUTURAS	40
9.	REFERÊNCIAS	41
10.	ANEXO	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Amostras coletadas, com seu respectivo origem e local de coleta	11
Tabela 2 – Oligonucleotídeos gênero-específicos amebianos utilizados para PCR, juntamente com o tamanho do <i>amplicon</i> esperado e a temperatura de anelamento utilizada.....	15
Tabela 3 – Oligonucleotídeos gênero-específicos bacterianos utilizados para PCR, juntamente com o tamanho do <i>amplicon</i> esperado e a temperatura de anelamento utilizada.....	19
Tabela 4 – Presença de AVL nas amostras e local de coletas	22
Tabela 5 – Identificação das AVL potencialmente patogênicas através de oligonucleotídeos gênero-específicos amebianos nas amostras coletadas	23
Tabela 6 – Identificações das amostras através dos oligonucleotídeos que amplificam o gene 16S rDNA Domínio Bacteria	25
Tabela 7 – Identificação de BRA nas amostras coletadas através de reações de PCR utilizando oligonucleotídeos gênero-específicos	26
Tabela 8 – Micro-organismos identificados pela culturômica.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Hifa de <i>F. solani</i> emergindo de <i>A. castellanii</i> . Nunes et al. (2016).....	4
Figura 2 – (A) Partículas virais de <i>Lausannevirus</i> no citoplasma de <i>A. castellanii</i> . (B) Partículas virais de <i>Lausannevirus</i> (verde) através da técnica de imunofluorescência e microscopia confocal após 8h de infecção em <i>A. castellanii</i>	5
Figura 3 – A: Microscopia de contraste de fase - Internalização de <i>Arcobacter butzleri</i> nos vacúolos de <i>A. castellanii</i> após 50 minutos de cocultura, através da microscopia de contraste de fase. Villanueva et al. (2016). B: Coloração de Gimenez mostrando <i>V. vermiformis</i> contendo bactérias intracelulares.....	7
Figura 4 – Locais onde foram realizadas as coletas no Parque Farroupilha.....	10
Figura 5 – Técnica de enriquecimento amebiano.....	13
Figura 6 – Migração amebiana.....	14
Figura 7 – Esquema da placa de amostra na cocultura amebiana.	16
Figura 8 – Técnica de Cocultura amebiana.....	17
Figura 9 – Esquema da placa de inoculação de amostra e das subculturas realizadas na técnica de cocultura amebiana.....	18
Figura 10 – Valores do escore de identificação pelo MALDI-TOF (<i>Software</i> MALDI-TOF MS Biotyper Bruker).....	21
Figura 11 – Colorações realizadas nas lamínulas retiradas das placas de cocultura após 24h de interação.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANN	Ágar Não-Nutriente
AVL	Amebas de Vida Livre
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BRA	Bactéria Resistente à Ameba
C.E.	Centro de Esterilização
CME	Central de Material e Esterilização
CTI	Centro de Tratamento Intensivo
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HSC	Hospital de Santa Cruz
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
MRA	Micro-organismo Resistente à Ameba
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
UIP	Unidade de Internação Pediátrica
UTI	Unidade de Terapia Intensivo

1. INTRODUÇÃO

Amebas de vida livre (AVL) podem ser encontradas em diferentes tipos de ambientes, como água, solo e ar. São micro-organismos bastante resistentes pois possuem a capacidade de encistar ao entrarem em contato com condições adversas de temperatura, disponibilidade de nutrientes, pressão osmótica ou pH, permanecendo ficam viáveis por muito tempo e, quando o ambiente se torna favorável, transformam-se novamente na sua fase metabolicamente ativa chamada trofozoíto (RODRIGUEZ-ZARAGOZA, 1994).

As AVL alimentam-se de diversos micro-organismos, como fungos, algas, vírus, leveduras, outros protozoários e, principalmente, bactérias. Entretanto, algumas bactérias, vírus e fungos são chamados de micro-organismos resistentes a amebas (MRA) pois evitam ou escapam da fusão lisossomal, sobrevivendo à internalização e, em alguns casos, multiplicam-se dentro da ameba e as lisam (GREUB; RAOULT, 2004). Alguns desses MRA são fastidiosos ou não cultiváveis e, junto a isso, diversas espécies de importância clínica são consideradas MRA (THOMAS et al., 2010; BALCZUN; SCHEID, 2017).

As AVL possuem funções ecológicas e evolutivas com algumas espécies de bactérias resistentes a amebas (BRA): formam um nicho replicativo para as bactérias, servem como armadura contra biocidas, podem ser usadas como “cavalos de Tróia” (vetores) para invadir hospedeiros e causar infecções, auxiliam na criação de novos modos de disseminação, são usadas como “campos de treinamento” para aumentar a virulência e podem promover intercâmbio de genes (KEBBI-BEGHDADI, GREUB, 2014; KHAN, 2014).

Devido às AVL poderem ser utilizadas em estudos sobre interação com os MRA, assim como ferramentas para a descoberta de novos micro-organismos intracelulares (LA SCOLA et al., 2003c; EVSTIGNEEVA et al., 2009; LIENARD; GREUB, 2011; JACQUIER et al., 2013), o presente estudo tem como objetivo implementar novos métodos de identificação de micro-organismos e consequentemente abrir possibilidades para novos estudos visando melhor compreender as interações entre AVL e MRA.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Implementar no laboratório de Parasitologia da UFRGS métodos de crescimento de micro-organismos chamados cocultura e enriquecimento amebiano para auxiliar na identificação de micro-organismos ambientais.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.1.1 Avaliar se a metodologia da cocultura amebiana auxilia na identificação de MRA
- 2.1.2 Avaliar se a metodologia do enriquecimento amebiano auxilia na identificação de AVL
- 2.1.3 Avaliar a culturômica e MALDI-TOF MS como ferramentas para isolamento e identificação de MRA em amostras ambientais.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Amebas de vida livre

Amebas de vida livre (AVL) são protozoários unicelulares que podem ser encontrados em diferentes tipos de ambientes, como água, solo, esgoto, ar, biofilmes e nas interfaces água-solo, água-animal, água-ar, água-planta, onde se alimentam de fungos, bactérias, algas, vírus, leveduras e de outros protozoários (incluindo outras amebas). São capazes de sobreviver em condições adversas de temperatura, disponibilidade de nutrientes, pressão osmótica e pH (RODRIGUEZ-ZARAGOZA, 1994; DE CARLI; MOURA, 2001; LA SCOLA et al., 2003a). Possuem duas formas de vida: a forma metabolicamente ativa, chamada trofozoíto, e o cisto, que é a forma dormente e de resistência. Quando o ambiente possui condições desfavoráveis para sua sobrevivência, como falta de nutrientes ou condições inadequadas de temperatura, pH, escassez de nutrientes, etc., a ameba permanece viável na forma de cisto, devido sua alta resistência, até o ambiente se tornar favorável novamente e assim, desencistar para a forma trofozoítica (GREUB; RAOULT, 2004; NEVES, 2005).

Existem várias espécies conhecidas de AVL, porém os organismos mais estudados são *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia* spp., *Vermamoeba vermiformis* e *Naegleria* spp., por serem responsáveis por casos de infecção humana, como meningoencefalite amebiana primária, causada por *Naegleria fowleri* em indivíduos hígidos e encefalite amebiana granulomatosa, causada pelos gêneros *Acanthamoeba* e *Balamuthia*, em imunocomprometidos. Em pessoas imunocompetentes, o gênero *Acanthamoeba* e a espécie *V. vermiformis* já foram relacionados a ceratite amebiana (DE CARLI; MOURA, 2001; ABEDKHOJASTEH et al., 2013).

3.2 Amebas de vida livre como fontes de micro-organismos

No ambiente, a alimentação das AVL inclui principalmente bactérias, algas e fungos, os quais são digeridos por fusão lisossomal após a fagocitose. Entretanto, alguns desses micro-organismos resistem às amebas, evitam ou escapando da fusão ao lisossomo, sendo assim capazes de sobreviver, multiplicar-se e sair das AVL após a internalização. Esses micro-organismos são chamados por alguns autores de micro-organismos resistentes a amebas (MRA) (GREUB; RAOULT, 2004; LA SCOLA, 2014). Alguns micro-organismos internalizados em AVL possuem relação endossimbiótica variável com o hospedeiro, permanecendo dentro das AVL ou

causando lise das mesmas, dependendo das condições ambientais (GREUB et al., 2003).

Com o desenvolvimento da habilidade de permanecerem internalizados, os MRA adquiriram diferentes relações com as AVL. Uma das relações ecológicas entre AVL-MRA inclui transferência horizontal de genes entre diferentes micro-organismos no interior da ameba e entre MRA-AVL (GREUB; RAOULT, 2003; OGATA et al., 2006; THOMAS; GREUB, 2010).

Como os MRA permanecem viáveis dentro da ameba, protegidos de condições adversas, as AVL podem auxiliar na sua disseminação como um “Cavalo de Tróia” para infectar organismos, protegendo os MRA e enganando as defesas iniciais do sistema imune até atingir o local que provocará lise da ameba e, assim, causar a infecção no hospedeiro (KEBBI-BEGHDADI; GREUB, 2014; STAGGEMEIER et al., 2016; BALCZUN; SCHEID, 2017).

As AVL podem selecionar traços de virulência dos micro-organismos internalizados, como em um “campo de treinamento” (SCHEID, 2014). Cirillo et al. (1994, 1997) mostraram que as espécies patogênicas humanas *Legionella pneumophila* e *Mycobacterium avium* aumentaram sua virulência após contato com AVL. Entretanto, o aumento de virulência não se dá apenas nos micro-organismos internalizados. Um estudo realizado por Nunes et al. (2016) indica que o fungo *Fusarium solani*, após cocultura com *Acanthamoeba castellanii*, aumentou sua virulência e a ameba, por sua vez, também aumentou sua virulência após contato com o fungo (Figura 1). Esses dois micro-organismos estão relacionados a casos de ceratite, sendo relatados casos de coinfeção. Os dados deste estudo sugerem que a interação entre esse fungo e *Acanthamoeba* spp. pode levar a um agravamento de ceratites com esse tipo de coinfeção.

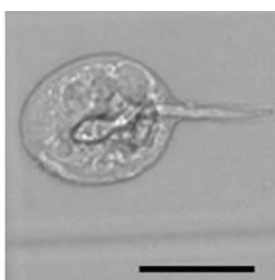


Figura 1 – Hifa de *Fusarium solani* emergindo de *Acanthamoeba castellanii*. Microscopia eletrônica (barra de escala: 25 μ m). Nunes et al. (2016).

La Scola et al. (2003c) descobriram um vírus que se assemelha a uma bactéria devido ao seu tamanho ao inocularem amostras de água de torres de resfriamento em cocultura com *Acanthamoeba polyphaga*. Essa primeira espécie de vírus gigante foi chamada de *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*, também conhecido apenas como Mimivirus, é um vírus NCLDV (*Nucleo-cytoplasmic Large Deoxyribovirus*), relacionado com *Iridoviridae*, *Baculoviridae*, *Phycodnaviridae* e *Poxviridae*, o qual possui 600 nm e um genoma de 1,2 Mb e é frequentemente relacionado a pacientes com pneumonia (LA SCOLA et al., 2003c; LA SCOLA, 2014). Outros vírus gigantes, como *Lausannevirus* (Figura 2), *Marseillevirus* e *Pandoravirus* também já foram isolados em amostras ambientais utilizando a cocultura amebiana (BOYER et al., 2009; THOMAS et al., 2011; PHILIPPE et al., 2013).

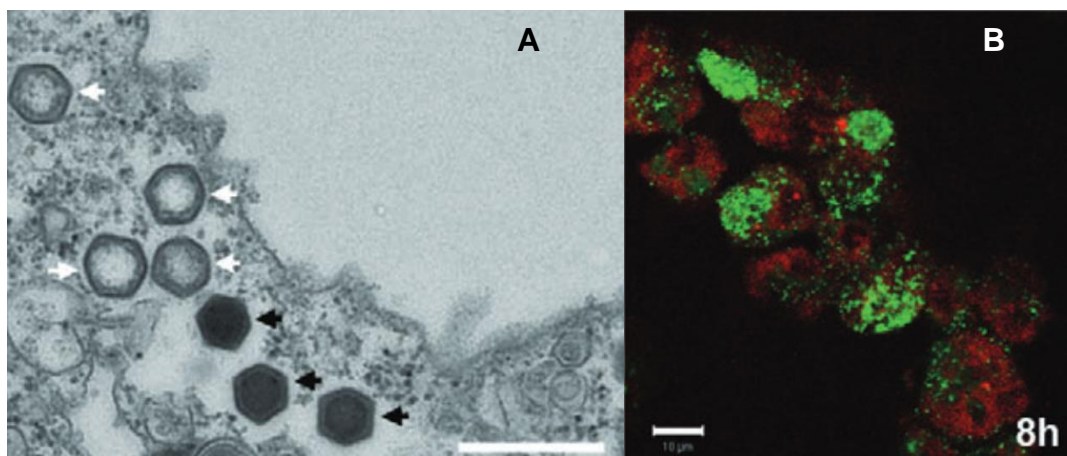


Figura 2 – (A) Microscopia eletrônica de partículas virais de *Lausannevirus* no citoplasma de *Acanthamoeba castellanii* (barra de escala: 500 nm). (B) Partículas virais de *Lausannevirus* (verde) através da técnica de imunofluorescência e microscopia confocal após 8h de infecção em *A. castellanii* (barra de escala: 10 μ m). Thomas et al. (2011).

3.3 Bactérias Resistentes a Amebas

Bactérias resistentes a amebas (BRA) podem ser isoladas de amostras ambientais e clínicas, tanto em trofozoítos quanto em cistos amebianos (GREUB; RAOULT, 2004; BALCZUN; SCHEID, 2017).

Entre as BRA conhecidas, existem espécies patogênicas ao ser humano, como *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas* spp., *Legionella pneumophila*, *Campylobacter jejuni*, *Klebsiella pneumoniae* e *Mycobacterium avium* (ROWBOTHAM, 1980; THOMAS et al., 1992; CIRILLO et al., 1997; SNELLING et al., 2005; KEBBI-BEGHDADI; GREUB, 2014; MASCHIO et al., 2015; MAISONNEUVE et al., 2017).

As BRA consideradas patogênicas representam um alto risco para a saúde

pública pois, ao estarem internalizadas em AVL, não são afetadas pelo tratamento convencional com biocidas devido a alta resistência das AVL (BALCZUN; SCHEID, 2017).

Bactérias ditas fastidiosas se mostraram viáveis por mais tempo e se tornaram mais fáceis de se identificar em amostras clínicas após cocultura amebiana. Cepas de *Campylobacter jejuni* sobreviveram por períodos mais longos quando cultivadas com amebas do que quando cultivadas sozinhas (AXELSSON-OLSSON et al., 2005) e após cocultura amebiana o diagnóstico de *Legionella anisa* foi facilitado, tornando-se um método de diagnóstico mais sensível e conveniente comparado ao método de diagnóstico apenas com meios de cultivo específicos (LA SCOLA et al., 2001).

3.4 Enriquecimento e Cocultura Amebiana

Devido ao grande número de micro-organismos que podem ser encontrados em AVL, as amebas se tornaram uma ferramenta valiosa para seu isolamento e identificação. Com o objetivo de identificar MRA, dois métodos foram elaborados por Lienard e Greub (2011), chamados cocultura amebiana e enriquecimento amebiano.

O método de cocultura amebiana, utilizando amostras ambientais ou clínicas, permite aos micro-organismos presentes nas amostras utilizarem AVL como hospedeira, sendo necessária observação frequente para verificar se os micro-organismos invadiram as células amebianas ou provocaram lise amebiana. Já no método de enriquecimento amebiano há o isolamento de AVL em ágar não-nutritivo (ANN) coberto com *Escherichia coli* inativada, e analisa-se a possibilidade dessas amebas isoladas carream micro-organismos internalizados. Em ambos os métodos o DNA é extraído e os MRA e AVL podem ser identificados através de oligonucleotídeos universais, como 16S rDNA para bactérias e 18S rDNA para amebas, ou oligonucleotídeos específicos, de acordo com o objetivo do estudo, podendo ser complementado com microscopia eletrônica, colorações e hibridização fluorescente *in situ* (FISH) (JACQUIER et al., 2013). Lienard e Greub (2011) discorrem que a cocultura amebiana é mais eficiente que o enriquecimento amebiano para a recuperação de bactérias intracelulares, podendo ambas as técnicas serem usadas em paralelo pois, enquanto a cocultura amebiana fornece informações sobre MRA, o enriquecimento amebiano também pode fornecer informações sobre os hospedeiros

dos MRA isolados. Ambos métodos já promoveram diversos isolamentos bacterianos e virais (Figura 3).

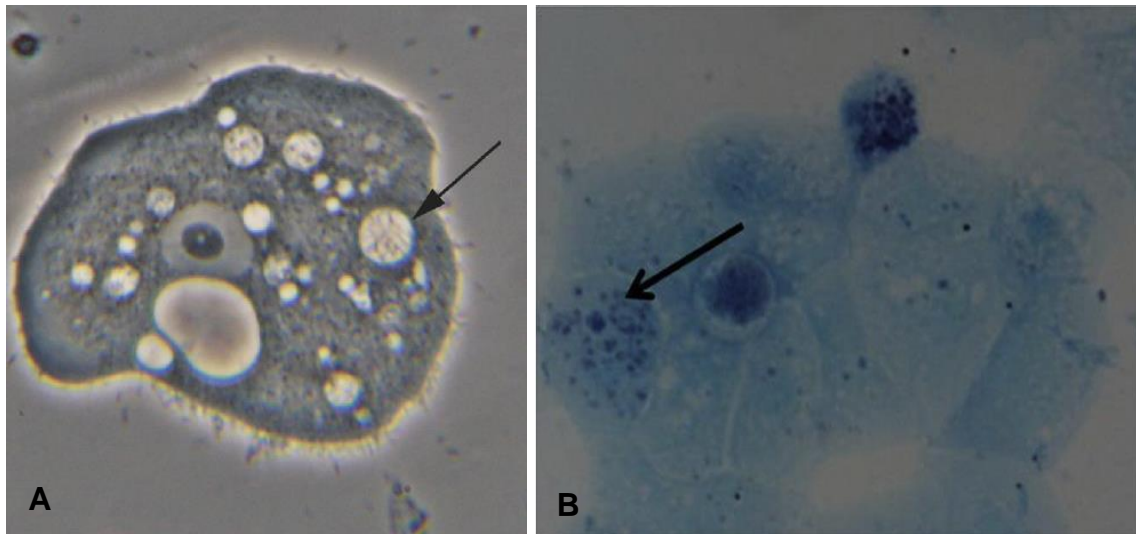


Figura 3 – A: Microscopia de contraste de fase - Internalização de *Arcobacter butzleri* nos vacúolos de *A. castellanii* após 50 minutos de cocultura, através da microscopia de contraste de fase. Villanueva et al. (2016). B: Microscopia óptica (100 X) – Coloração de Gimenez mostrando *V. vermiformis* contendo bactérias intracelulares. Pagnier et al. (2015).

A cocultura e o enriquecimento amebiano podem ser utilizados para avaliação da biodiversidade ambiental e para o descobrimento de novas espécies de micro-organismos (LA SCOLA et al., 2003c; EVSTIGNEEVA et al. 2009; PAGNIER et al., 2015; LIENARD et al., 2017; ANDREANI et al., 2017; BALCZUN; SCHEID, 2017; YOUSUF et al., 2017), assim como utilizar amostras clínicas e de ambientes hospitalares a fim de avaliar AVL e MRA associados a doenças (LA SCOLA et al., 2003a; GREUB; RAOULT, 2004; THOMAS et al., 2006; PAGNIER et al., 2015).

3.5 Culturômica

O método da culturômica foi criado por Lagier et al. (2012) para identificação de espécies bacterianas da microbiota intestinal humana, com o objetivo de identificar o maior número possível de bactérias da amostra utilizando diferentes condições de crescimento. A identificação é realizada via MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass-Spectrometry*) e, caso não seja possível a identificação dessa forma, o gene 16S é amplificado e sequenciado (AMRANE et al., 2018; LAGIER et al., 2018). Lagier et al. (2012), ao elaborarem esse método, utilizaram 212 diferentes condições de crescimento bacteriano, incluindo

cocultura amebiana, para analisar três amostras de fezes de três pessoas diferentes. Como resultado, a equipe identificou 340 espécies de bactérias, sendo 174 destas ainda não descritas como presentes no intestino humano e 31 novas espécies e gêneros bacterianos. Comparando aos resultados da metagenômica, método de identificação usualmente empregado em pesquisas em microbiota intestinal, utilizando as mesmas amostras de fezes, a equipe identificou 698 filotipos, dentre eles 282 espécies já conhecidas. Entretanto, apenas 51 espécies identificadas pela metagenômica se sobrepõem com a identificação pela culturômica. Através desse trabalho, a culturômica se mostrou complementar à metagenômica, principalmente pela capacidade de identificar populações menos abundantes, em estudos do microbioma intestinal.

Apesar do maior foco das pesquisas envolvendo amostras de origem humana serem de amostras de fezes, a culturômica abriu espaço para estudos envolvendo microbiota humana geral, com outros tipos de amostra. Por exemplo, amostras oriundas da pele, do leite materno, da boca, de fluido vaginal, da região sinusal e da urina foram utilizadas na culturômica, proporcionando até mesmo a descoberta de novas espécies bacterianas (MORAND et al., 2016; BRAHIMI et al., 2017; BELKACEMI et al., 2018a; BELKACEMI et al., 2018b; BEYE et al., 2018; DIOP et al., 2018; FALL et al., 2018; NDIAYE et al., 2018; TOGO et al., 2018).

Além de pesquisas com o objetivo de identificar espécies bacterianas da microbiota humana, a culturômica também está sendo utilizada em pesquisas envolvendo amostras animais e ambientais. Papadioti et al. (2017a, 2017b, 2017c) e Azhar et al. (2017a, 2017b) identificaram, através da culturômica e metagenômica, novas espécies bacterianas em amostras de ar em ambiente urbano. Djaballah et al. (2018) identificaram uma nova espécie bacteriana, *Streptomyces massialgeriensis*, em um solo extremamente salino. Pesquisas envolvendo insetos também têm utilizado a culturômica: González-Escobar et al. (2018) utilizaram o método para identificar bactérias do intestino de larvas de formiga e Tandina et al. (2016) utilizaram para identificar e comparar a microbiota intestinal de mosquitos adultos selvagens com os de laboratório, além de utilizar a culturômica para identificar as bactérias presentes na água de reprodução desses mosquitos. Diop et al. (2016) mostraram que a culturômica também pode ser usada para estudos de microbiota de alimentos ao testarem meios de cultivo com elevada concentração salina para determinar a cultura microbiana halófila de um sal de mesa comercial.

A culturômica tem se mostrado eficiente em diversos tipos de pesquisa, auxiliando o conhecimento sobre diferentes tipos de microbiomas e oportunizando a descoberta de novas espécies bacterianas.

3.6 Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF MS)

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF MS) é uma técnica de espectrometria de massa que tem ganho popularidade nas análises clínicas e nas pesquisas em microbiologia por permitir a identificação de micro-organismos de forma mais rápida e com baixo custo comparado às técnicas convencionais, onde o padrão do espectro de proteína obtido do micro-organismo alvo é comparado com bancos de dados do sistema (RAHI et al., 2016). Um dos equipamentos de MALDI-TOF MS presente no mercado, o qual foi utilizado neste trabalho, pertence à empresa Bruker Daltonics, cujo *software* Biotyper possui banco de dados para identificações de bactérias Gram positivas e negativas, micobactérias, leveduras e fungos filamentosos. Este equipamento possibilita a adição de novos dados nesse banco (BRUKER, 2018). O MALDI-TOF MS, conforme mencionado no item 3.4, tem sido uma ótima ferramenta complementar à culturômica. No estudo de Dubourg et al. (2018), por exemplo, a análise via MALDI-TOF MS foi correta em 95,2% de 105 colônias identificadas como novas espécies isoladas através da culturômica.

Del Chierico et al. (2016) e Megha et al. (2018) conseguiram otimizar o banco de dados de seus *softwares* do MALDI-TOF MS ao incluir o padrão do espectro de massa individual, chamado *fingerprint* ou *biomarker*, de diferentes genótipos de *Acanthamoeba*, possibilitando que seus equipamentos sejam capazes de realizar a identificação dessas amebas. Moura et al. (2015) também otimizaram o banco de dados do MALDI-TOF para diferenciar espécies de *Naegleria* e os diferentes isolados de *N. fowleri*.

Para estudos de bactérias associadas e/ou resistentes a amebas também é possível utilizar o MALDI-TOF MS para identificação. Pagnier et al. (2015) utilizaram essa técnica para identificar as bactérias associadas em isolados de *V. vermiformis* de água de ambiente nosocomial. Trnková et al. (2018) sugeriram o MALDI-TOF MS como uma ferramenta de identificação rápida de *Legionella pneumophila* após identificarem a presença dessa bactéria internalizada em AVL.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local de desenvolvimento do projeto

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

4.2 Coletas

Um total de 23 amostras foram coletadas entre outubro de 2017 e maio de 2018. Quatro amostras foram coletadas no Parque Farroupilha (Figura 4), localizado em Porto Alegre/RS, onze amostras no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), localizado em Porto Alegre/RS e oito amostras no Hospital Santa Cruz (HSC), localizado em Santa Cruz/RS (Tabela 1). Para cada local escolhido, seja de ambiente hospitalar quanto do Parque Farroupilha, foi coletado 1 L de água em um recipiente estéril e transportado em isopor até o Laboratório de Parasitologia, onde permaneceu refrigerado por no máximo 24 horas para análise.

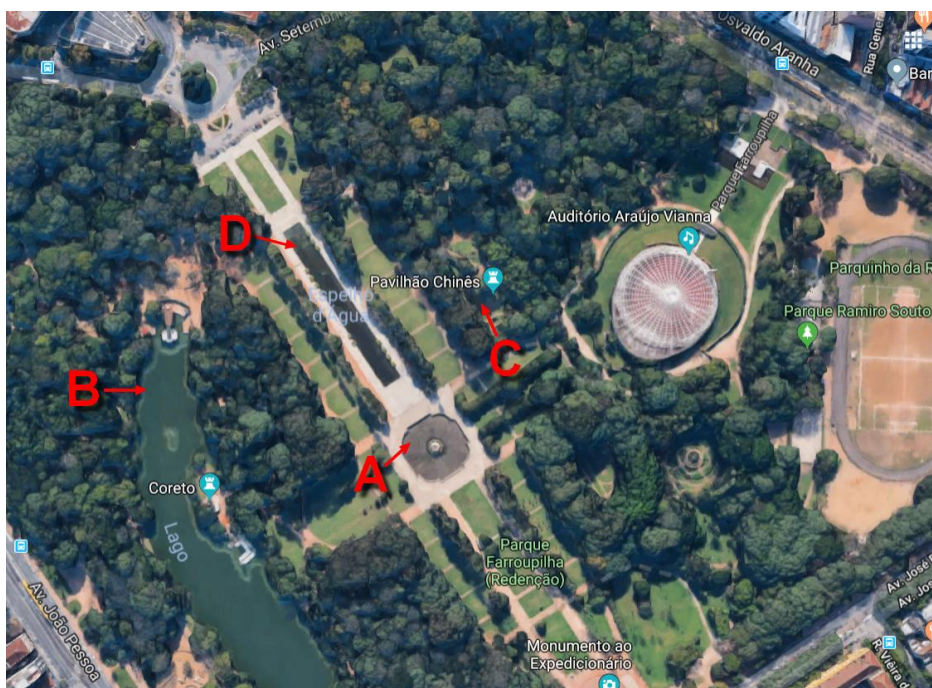


Figura 4 – Locais onde foram realizadas as coletas no Parque Farroupilha. A: Fonte; B: Lago 1; C: Lago 2; D: Espelho. Fonte: Adaptado de Google Maps (2018).

As amostras hospitalares eram provenientes de água da torneira, bebedouro ou chuveiro, exceto uma amostra que foi coletada do balde da água da limpeza após lavagem de uma ala do HSC.

As coletas no ambiente hospitalar foram realizadas mediante aprovação de projeto na Plataforma Brasil, sob nº CAAE 78018717.0.1001.5327 para as coletas realizadas no HCPA e 55494716.3.0000.5343 para as coletas no HSC.

Tabela 1 – Amostras coletadas, com seu respectivo origem e local de coleta

N	Nome da amostra	Nome da amostra e origem	Local
1	Fonte	Fonte principal	
2	Lago 1	Lago principal	Parque
3	Lago 2	Lago menor	Farroupilha
4	Espelho	Espelho d'água	
5	Balde	Balde de limpeza após lavagem da Ala São Francisco	
6	UTI	Água da torneira da Unidade de Tratamento Intensivo (UTI)	
7	CME	Torneira da Central de Material e Esterilização (CME)	
8	S.F.	Chuveiro de um quarto da Ala São Francisco (S.F.)	HSC
9	CTI	Torneira do Centro de Tratamento Intensivo (CTI)	
10	UTIP	Torneira da UTI Pediátrica (UTIP)	
11	Emergência	Torneira da Emergência	
12	C.E.	Torneira do Centro de Esterilização (C.E.)	
13	CH UIP	Chuveiro da Unidade de Internação Pediátrica (UIP)	
14	EXP UIP	Torneira do Expurgo da UIP	
15	CTI 2	Torneira do CTI 2	
16	Isolamento	Torneira do Isolamento da UTI 2	
17	PED BBD	Bebedouro da Pediatria	
18	UTIP A1	Torneira da UTIP Área 1	HCPA
19	UTIP A2	Torneira da UTIP área 2	
20	CH BB	Chuveirinho dos bebês UIP	
21	ENF HM	Torneira da enfermaria da Hemodinâmica	
22	HM BBD	Bebedouro do setor Hemodinâmica	
23	NUTR CTI	Bebedouro da sala de Nutrição da CTI	

4.3 Processamento das amostras

O trabalho foi desenvolvido adaptando a metodologia de Lienard e Greub (2011).

Todas as amostras foram filtradas através de um *holder* de filtração à vácuo

com membrana de policarbonato com poros de 0,22 µm e 47 mm de diâmetro. Após a filtragem a membrana foi removida com o auxílio de uma pinça, colocada em uma placa de Petri e lavada com 1 mL de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) estéril, removendo o material com o auxílio de um raspador, para desprender os microorganismos da membrana. A seguir, foi realizada a técnica de diluição seriada (1 a 10⁴) e as amostras reservadas em tubos de microcentrífuga para uso nos métodos de enriquecimento e cocultura amebiana, detalhados nos itens 4.3.1 e 4.3.2. Os procedimentos a seguir foram realizados para cada amostra.

4.3.1 Enriquecimento amebiano

Para cada amostra foi coletado 50 µL do sedimento do tubo de microcentrífuga contendo a amostra não diluída e inoculado em uma placa de Petri com ágar não-nutriente 1,5% (ANN) coberto com *Escherichia coli* inativada pelo calor (Figura 5). O sedimento foi inoculado no canto do ANN, deixando a gota da amostra escorrer no centro do ágar até a outra ponta da placa de Petri com o objetivo de, caso a amostra contenha AVL, permitir a visualização da migração amebiana (Figura 6). Esse procedimento foi realizado em triplicata. As placas foram lacradas com Parafilm®, incubadas a 30 °C e observadas diariamente ao microscópio óptico, utilizando a objetiva de 10X.

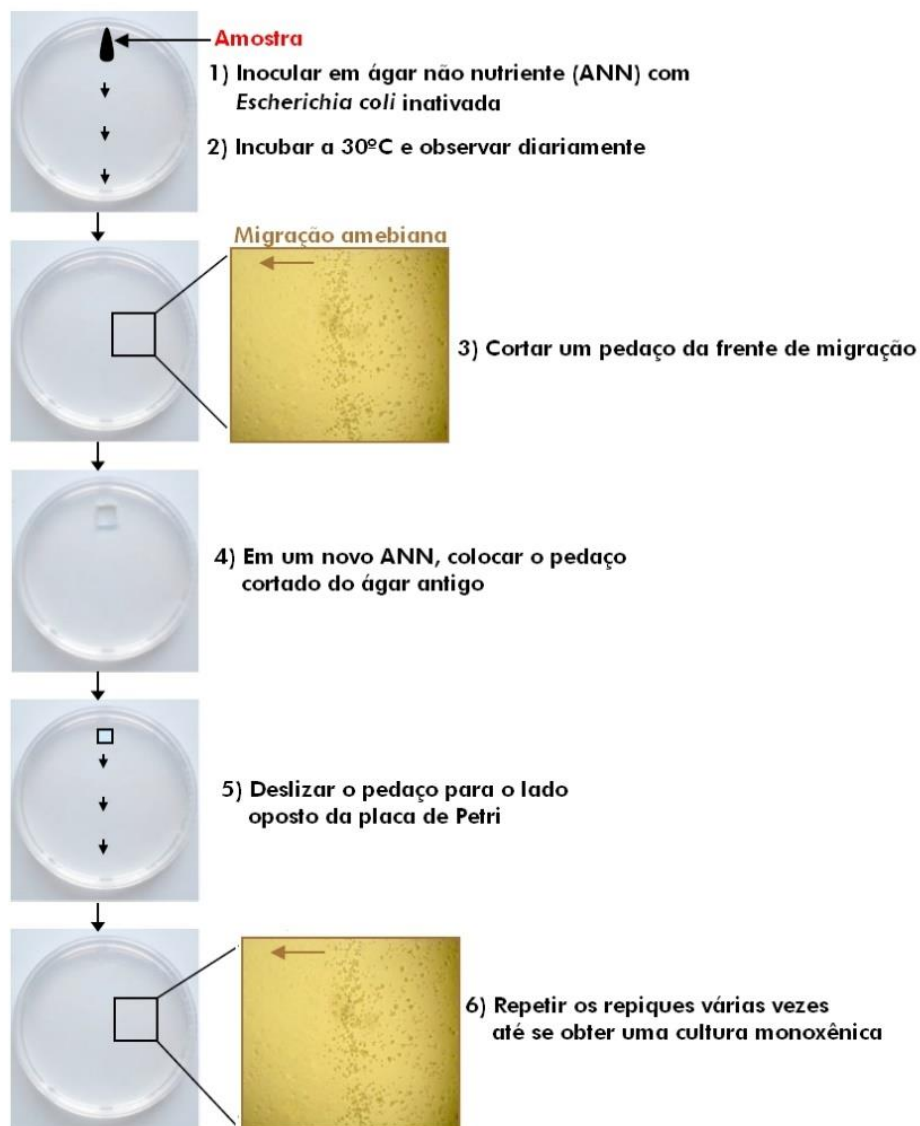


Figura 5 – Técnica de enriquecimento amebiano. Adaptado de KEBBI-BEGHDADI; GREUB (2014).

As placas que não apresentaram crescimento amebiano em até 10 dias foram descartadas. As placas em que houve crescimento amebiano foram repicadas, fazendo um pequeno corte no ANN utilizando uma lâmina de bisturi estéril e inoculando o pedaço do ANN com a face voltada para baixo em uma nova placa contendo ANN com *E. coli* inativada, arrastando o pedaço de ANN de uma ponta a outra no centro da nova placa, que era então selada com Parafilm® e incubada a 30°C. Todos os procedimentos foram realizados em ambiente estéril para evitar contaminação. Esse repique foi repetido várias vezes até obter uma cultura monoxênica.

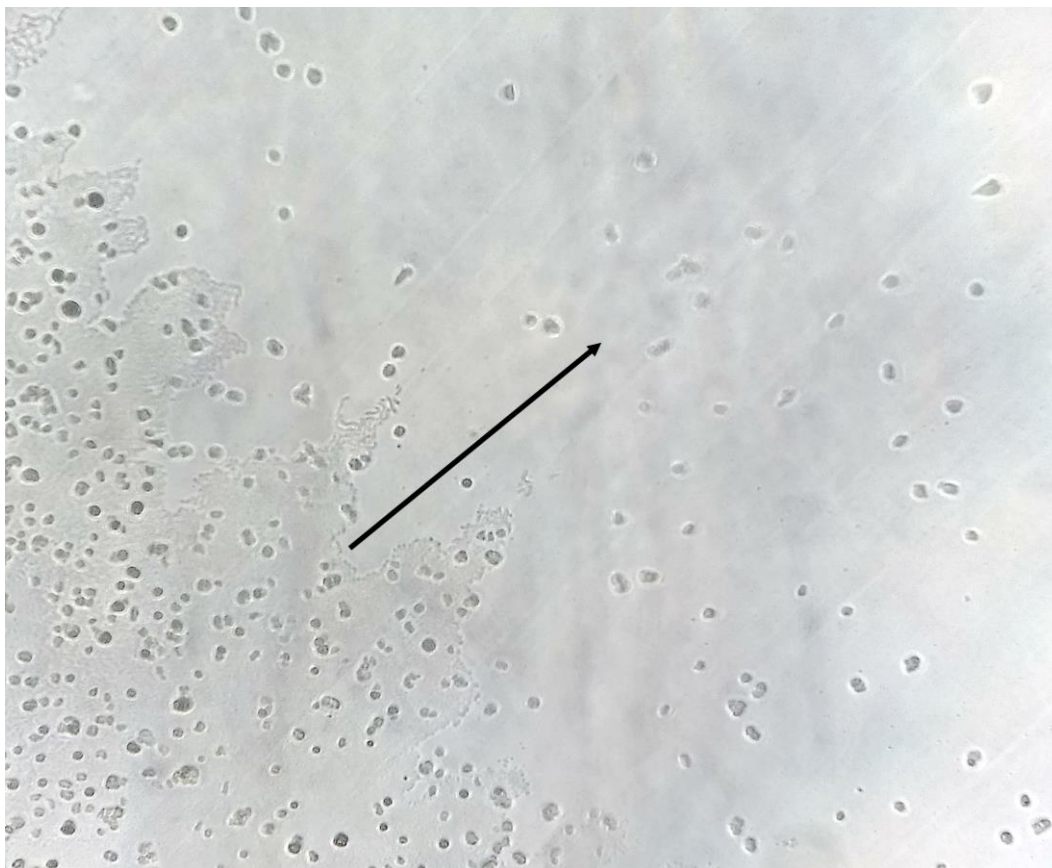


Figura 6 – Migração amebiana. Seta indica direção da migração realizada pelas AVL. Microscópio óptico, aumento 100X.

Para o processo de identificação, as células foram raspadas da placa de Petri, após deixar a placa sob o gelo para desprender as amebas do ANN, centrifugadas a $1106 \times g$ por 10 minutos e ressuspensas em $200 \mu\text{L}$ de PBS. O DNA foi extraído com o kit de extração Mini Spin Plus Kasvi[®], eluído a $50 \mu\text{L}$ e adicionada RNase. A identificação das AVL potencialmente patogênicas foi realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em volume final de $25 \mu\text{L}$, contendo 20-30 ng de DNA, $1 \mu\text{L}$ de cada oligonucleotídeo ($10 \text{ pmol}/\mu\text{L}$), $2,5 \mu\text{L}$ de tampão de reação 10X (50 mM KCl , 10 mM Tris-HCl), $1 \mu\text{L MgCl}_2$ (50 mM), $1 \mu\text{L}$ de dNTPs ($2,5 \text{ mM}$) e $0,2 \mu\text{L}$ Taq ($5 \text{ U}/\mu\text{L}$).

Os produtos da PCR foram analisados em eletroforese, com gel de agarose a 1,2% corado com GelRed, observando a presença do tamanho esperado do *amplicon*. Os oligonucleotídeos específicos para cada gênero de AVL, o tamanho do *amplicon* esperado e as temperaturas de anelamento utilizados para a realização das PCR estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos gênero-específicos amebianos utilizados para PCR, juntamente com o tamanho do *amplicon* esperado e a temperatura de anelamento utilizada

Organismo Alvo	Gene alvo	Sequência 5' – 3'	Tamanho do <i>amplicon</i> (bp)	Temperatura de anelamento	Referência
<i>Acanthamoeba</i>	Região ASA.S1	JDP1: 5'-GGCCCAGATCGTTTACCGTGA A-3' JDP2: 5'-TCTCACAAGCTGCTAGGGGATA-3'	450-500	60°C	Booton et al. (2005)
<i>Vermamoeba vermiformis</i>	18S rDNA	Hv1227F: 5'-TTACGAGGTCAG GACTGT-3' Hv1728R: 5'-GACCATCCGGAG TTCTCG-3'	505	58°C	Kuiper et al., (2006)
<i>Naegleria</i>	Região ITS	ITS1: 5'-GAACCTGCGTAGGGATCATT-3' ITS2: 5'-TTTCTTTTCCTCCCC TTATTA-3'	400-453	58°C	Pelandakis et al., (2000)

4.3.1.1 Teste de exflagelação

As amostras que obtiveram amplificação para o gênero *Naegleria* foram submetidas ao teste de exflagelação, adaptado de De Carli e Moura (2011). Adicionou-se 10 mL de água destilada estéril sobre a superfície do ANN das amostras para obtenção de uma suspensão de AVL, raspando suavemente a superfície do ágar. Após, a suspensão foi transferida para garrafas de cultivo celular e incubadas a 37°C. As garrafas foram examinadas periodicamente a cada 4 horas em microscópio invertido para verificar a presença de flagelados.

A espécie *N. fowleri* é a única espécie de AVL conhecida por sofrer transformações para a forma temporária piriforme flagelada em contato com água com temperatura próxima a 40°C, usualmente emergindo dois flagelos. Nessa fase a ameba não se alimenta até reverter sua forma ao estágio de trofozoíto (DE CARLI; MOURA, 2011).

4.3.2 Cocultura amebiana

Para a realização do método da cocultura amebiana cultivou-se axenicamente *Acanthamoeba castellanii* Neff-ATCC 30010 a 30 °C em frascos de cultura celular contendo meio PYG (proteose peptona 2%, extrato de levedo 0,2% e glicose 1,8%). As amebas foram desprendidas das paredes dos frascos de cultura utilizando PBS e transferidas para um tubo e centrifugadas durante 10 min a 573 x g. O *pellet* foi lavado três vezes com PBS e ressuspenso em PYG. As células foram contadas e as amebas foram transferidas para uma microplaca de 24 poços conforme Figura 7, de modo que cada poço continha 1 mL de PYG com 5x10⁵ células/mL. A

placa foi incubada 12 horas a 30 °C, após adição de 10 µL de antibióticos (400 UI/ mL de Penicilina G Potássica e 400 µg/mL de Estreptomicina) em cada poço para evitar contaminação bacteriana durante a incubação.

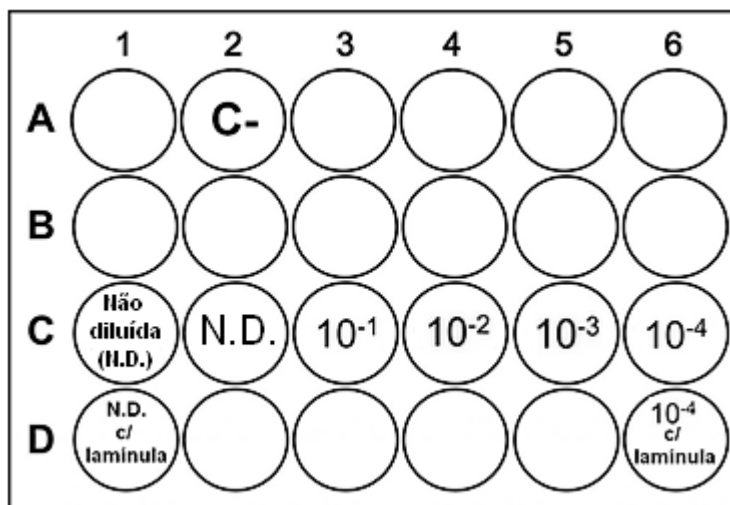


Figura 7 – Esquema da placa de amostra na cocultura amebiana. Placa com um poço para controle negativo (amebas+antibiótico), dois poços para amostra não diluída e um poço para cada diluição seriada realizada (10⁻¹ a 10⁻⁴). Lamínulas redondas de 13 mm foram colocadas nos poços (da duplicata) contendo a amostra não diluída e a amostra com diluição 10⁻⁴ para colorações.

No dia seguinte, a microplaca foi centrifugada a 1.800 x g por 10 minutos e o PYG cuidadosamente substituído por PBS. A centrifugação foi realizada para evitar perda de amebas não aderidas ao fundo. Após a troca do meio, a microplaca foi incubada durante pelo menos 2 horas a 30°C para sedimentação e aderência das amebas ao fundo dos poços.

Após o período de sedimentação e aderência, 100 µL de cada diluição da amostra foi inoculado em um poço da microplaca. A amostra não diluída foi feita em duplicata. Após a inoculação, a microplaca foi centrifugada a 1.800 x g por 10 minutos, para aumentar o contato e induzir a fagocitose de micro-organismos, se presentes, pelas amebas e em seguida as microplacas foram incubadas durante 1 hora a 30°C. Após esse tempo foram lavadas três vezes com PBS, substituindo por PBS fresco e adicionando 10 µL de antibióticos (400 UI/ mL de Penicilina G Potássica e 400 µg/mL de Estreptomicina) e 10 µL de Vancomicina (1mg.10mL⁻¹).

A microplaca foi acondicionada em atmosfera umidificada e em seguida incubada a 30°C. Os poços foram observados diariamente utilizando um microscópio invertido para verificar a presença de bactérias invadindo as amebas. A metodologia

pode ser observada resumidamente na Figura 8. Após 24 horas, as lamínulas dos poços D-1 e D-4 da microplaca (Figura 7) foram removidas e coradas pelas técnicas de Gram ou Giemsa para visualização em microscópio óptico.

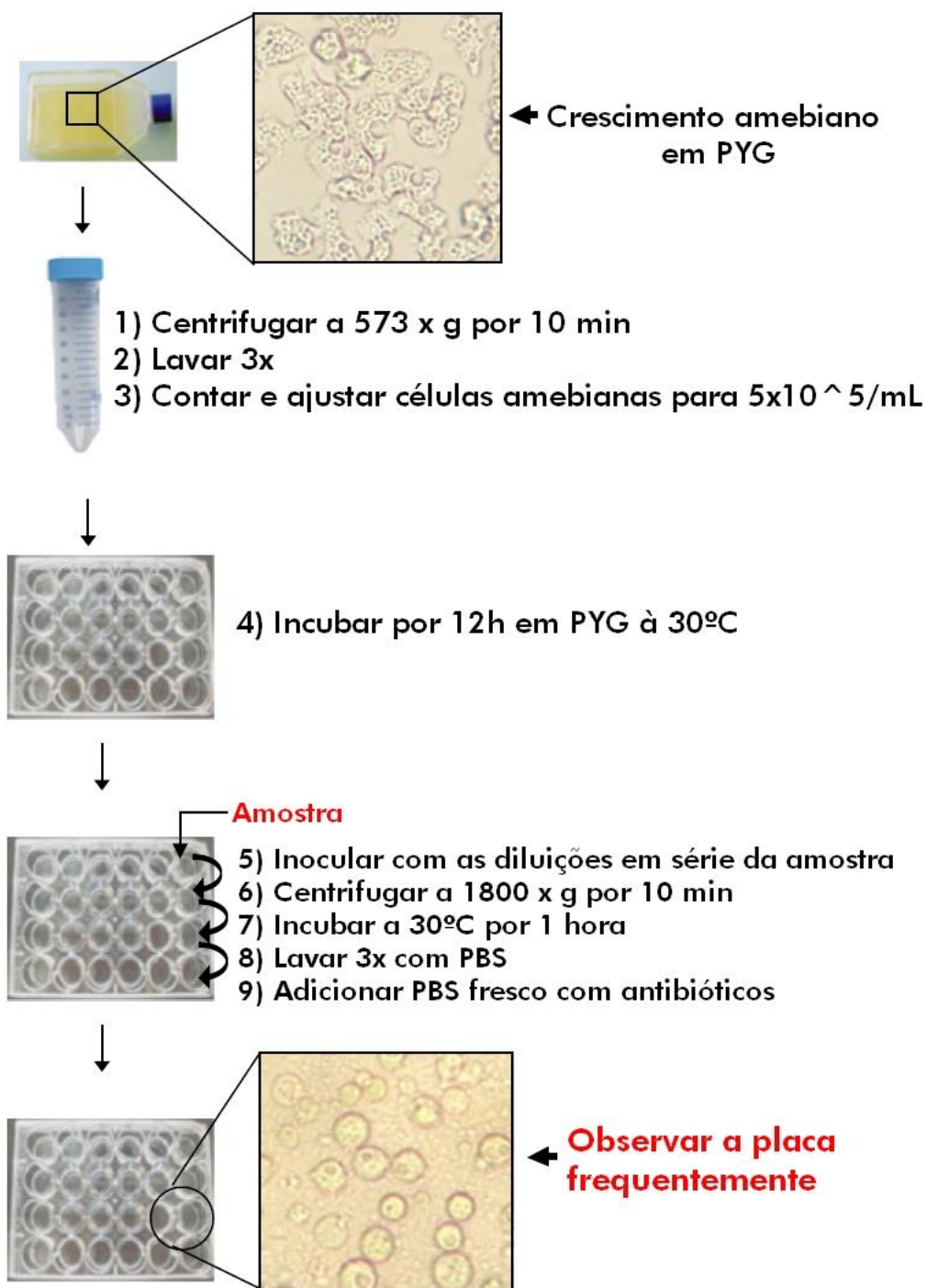


Figura 8 – Técnica de Cocultura amebiana. Adaptado de KEBBI-BEGHDADI; GREUB (2014).

A cada 7 dias era feita uma subcultura, com o objetivo de evitar a proliferação de fungos e oportunizar a multiplicação de possíveis bactérias presentes na amostra. Foi inoculado 100 μL de cada poço de amostra em novos poços contendo 5×10^5 amebas em 1 mL de PBS, repetindo-se os processos de centrifugação, incubação, lavagens e adição de antibióticos conforme a primeira inoculação. Cada subcultura possuía um poço de controle negativo. Nas subculturas das amostras não haviam lamínulas para colorações. No encerramento de cada subcultura, o material restante nos poços era coletado, centrifugado a $1106 \times g$ por 10 minutos e armazenado no *freezer* para posterior extração de DNA. No total foram realizadas duas subculturas e três coletas para extração (Figura 9). Nas amostras coletadas no Parque Farroupilha, foi realizada uma subcultura adicional no dia 3 da inoculação da amostra devido a proliferação excessiva de fungos.

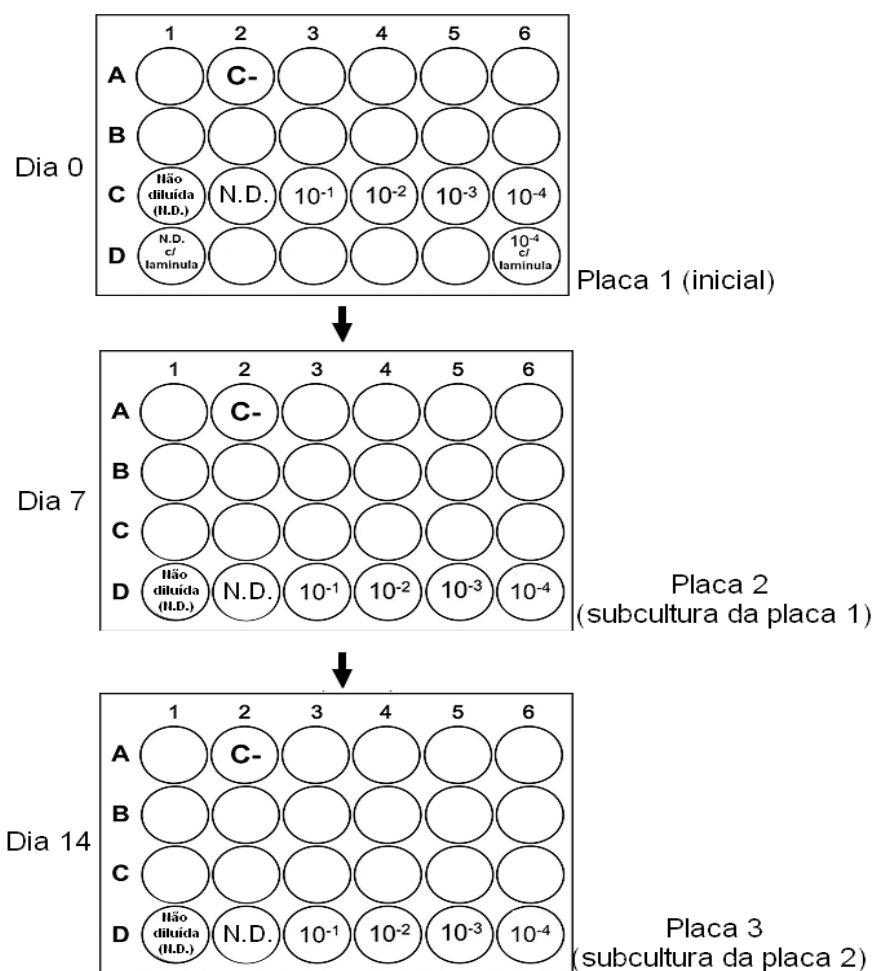


Figura 9 – Esquema da inoculação de amostra e das subculturas realizadas na técnica de cocultura amebiana. Dia 0: primeira inoculação na placa 1. Dia 7: subcultura da placa 1 e coleta do material restante para extração de DNA. Dia 14: subcultura da placa 2 e coleta do material restante para extração de DNA.

Após o encerramento do tempo de incubação da última subcultura (21º dia) o material retirado da placa era reunido com o material que havia sido reservado para posterior extração de DNA, centrifugado a 1106 x g por 10 minutos e ressuspendido em 200 µL. A extração de DNA foi realizada utilizando o kit de extração Mini Spin Plus Kasvi®, onde a amostra final era eluída a 50 µL e então adicionada RNase. As identificações das bactérias foram feitas através de PCR, em volume final de 25 µL, contendo 20-30 ng de DNA, 1 µL de cada oligonucleotídeo (10 pmol/ µL), 2,5 µL de tampão de reação 10X (50 mM KCl₂, 10 mM Tris-HCl), 1 µL MgCl₂ (50 mM), 1 µL de dNTPs (2,5 mM) e 0,2 µL Taq (5 U/ µL). Os produtos da PCR foram analisados em eletroforese utilizando gel de agarose a 1,2%, corado com GelRed, observando a presença do tamanho esperado do *amplicon*. Os oligonucleotídeos específicos para cada gênero de AVL, o tamanho do *amplicon* esperado e as temperaturas de anelamento utilizados para a realização das PCR estão descritos na Tabela 3. As amostras positivas para o domínio Bacteria utilizando os oligonucleotídeos fD1 e rP2 foram sequenciadas e suas sequências foram comparadas utilizando o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) a fim de classificar os isolados obtidos (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Tabela 3 – Oligonucleotídeos gênero-específicos bacterianos utilizados para PCR, juntamente com o tamanho do *amplicon* esperado e a temperatura de anelamento utilizada

Organismo Alvo	Gene alvo	Sequência 5' – 3'	Tamanho do <i>amplicon</i> esperado (bp)	Temperatura de anelamento	Referência
Domínio bactéria	16S rDNA	fD1:CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGAT CCTGGCTCAG rP2:CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCT TGTTACGACTT	1400-1500	60°C	Weisburg et al. (1991)
<i>Legionella</i>	16S rDNA	LEG225:AAGATTAGCCTGCGTCCGA LEG858:GTCAACTTATCGCGTTTGCT	654	58°C	Miyamoto et al. (1997)
<i>Pseudomonas</i>	16S rDNA	PAGSF:GACGGGTGAGTAATGCCTA PAGSR:CACTGGTGTTCCTTCTATA	618-620	65°C	Spilker et al. (2004)
<i>Mycobacterium</i>	<i>hsp65</i>	Hsp65-dir: CCCGTACGAGAAGATCGG Hsp65-rev: GACTCCTCGACGGTGATG	354-368	60°C	Calvo et al. (2013)

4.3.3 Culturômica

A metodologia de Tandina et al. (2016) foi adaptada para estudo da diversidade de BRA em amostras de água. Foram escolhidas de forma aleatória as amostras Fonte, Lago 1, Lago 2, CTI, UTIP, Emergência, C.E., UTIP Área 2 e Chuveirinho dos bebês UIP.

No 21^o dia de incubação da cocultura amebiana das amostras selecionadas, todo o material dos poços de amostra foi coletado, centrifugado a 1106 x g por 10 minutos e ressuspenso com 2 mL de PBS. O volume de 1 mL foi reservado para extração de DNA utilizado na técnica de cocultura e 1 mL foi separado para lise amebiana, a qual permite a liberação de possíveis bactérias internalizadas, e inoculação em meio de cultivo para culturômica. A lise dos trofozoítos foi realizada através de choque térmico (um minuto no gelo e um minuto à 37°C, repetindo três vezes) seguida de lise por ação mecânica (passando-se a amostra sete vezes em uma seringa com agulha 26G estéreis).

Após a lise, o material foi inoculado em um meio de pré-incubação estéril contendo 10 g/L de caldo infusão cérebro-coração, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de peptona bacteriológica em 1000 mL de água destilada. Optou-se pela incubação aeróbica em estufa de 30°C por ser a melhor condição de cultura para aumentar o número de espécimes estudados, já que as amebas se mantêm bem nestas condições e as bactérias em questão estavam internalizadas nas mesmas. O meio permaneceu incubado por 1 mês e a cada 5 dias, a partir do 5^o dia, foram retiradas alíquotas de 1 mL do meio de pré-incubação e feita diluição seriada de 1/10 a 1/10⁵, onde cada diluição foi inoculada em Mueller Hinton com sangue (5%).

Após crescimento nos meios de cultivo, as colônias foram isoladas em novo Mueller Hinton com sangue (5%) e submetidas à identificação por MALDI-TOF MS (Biotyper Bruker Daltonics), utilizando-se o método de extração (Anexo I). Os resultados do MALDI-TOF MS foram avaliados segundo escore do próprio *software*, conforme Figura 10.

Range	Description
2.300 ... 3.000	highly probable species identification
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification
1.700 ... 1.999	probable genus identification
0.000 ... 1.699	not reliable identification

Figura 10 – Valores do escore de identificação pelo MALDI-TOF MS (*Software* MALDI-TOF MS Biotyper Bruker).

5. RESULTADOS

5.1 Enriquecimento amebiano

Das 23 amostras analisadas, 11 (47,8%) foram positivas para AVL. Os resultados por amostra e local podem ser vistos na Tabela 4.

Tabela 4 – Presença de AVL nas amostras e local de coletas

N	Local	Nome da amostra	Resultado
1		Fonte	+
2	Parque Farroupilha	Lago 1	+
3		Lago 2	+
4		Espelho	+
5		Balde	-
6		UTI	-
7		CME	-
8	HSC	S.F.	-
9		CTI	+
10		UTIP	+
11		Emergência	+
12		C.E.	+
13		CH UIP	-
14		EXP UIP	-
15		CTI 2	+
16		Isolamento	+
17		PED BBD	-
18	HCPA	UTIP A1	-
19		UTIP A2	-
20		CH BB	-
21		ENF HM	-
22		HM BBD	+
23		NUTR CTI	-

Das 11 amostras positivas para AVL, 10 (90,9%) foram positivas para *Acanthamoeba* spp., 6 (54,5%) foram positivas para *Vermamoeba vermiformis* e 5 (45,4%) para *Naegleria* spp. (Tabela 5).

Tabela 5 – Identificação das AVL potencialmente patogênicas através de oligonucleotídeos gênero-específicos amebianos nas amostras coletadas

N	Nome da amostra	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	<i>Naegleria spp.</i>	<i>Acanthamoeba spp.</i>
1	Fonte	-	+	-
2	Lago 1	+	-	+
3	Lago 2	+	+	+
4	Espelho	+	+	+
5	CTI	-	+	+
6	UTIP	+	-	+
7	Emergência	+	-	+
8	C.E.	-	-	+
9	CTI 2	-	-	+
10	Isolamento	-	+	+
11	HM BBD	+	-	+

5.1.1 Teste de exflagelação

As amostras Fonte, Lago 2, Espelho, CTI e Isolamento foram submetidas ao teste de exflagelação. As amostras Fonte e Isolamento foram positivas para o teste, indicando a presença de *N. fowleri*.

5.2 Cocultura amebiana

Através das identificações moleculares foi possível verificar que todas as amostras foram positivas para MRA. Entretanto, a amostra “Espelho d’água”, do Parque Farroupilha, teve que ser descartada devido à presença excessiva de fungos filamentosos, impossibilitando a continuação do método nessa amostra.

As colorações das lamínulas existentes no fundo dos poços após 24 horas de interação da ameba hospedeira com a amostra permitiu visualizar micro-organismos internalizados em *A. castellanii* (Figura 11).

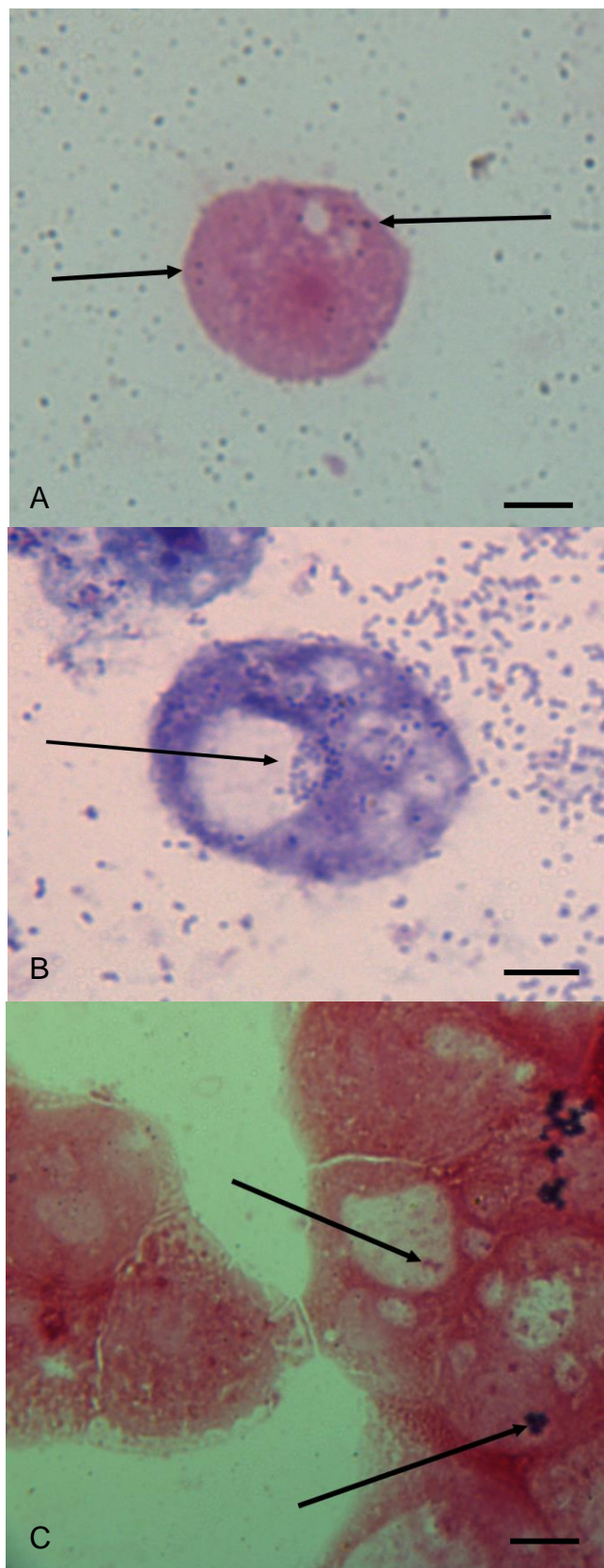


Figura 11 – Colorações realizadas nas lamínulas retiradas das placas de cocultura após 24 horas de interação mostrando a internalização de bactérias na cocultura com *Acanthamoeba castellanii* (barra de escala: 10 μ m). A: Coloração de Gram na amostra CH BB. B: Coloração Giemsa na amostra Balde (barra de escala: 7,0 μ m). C: Coloração de Gram na Amostra UTIP (barra de escala: 10 μ m). Microscópio óptico (1000X).

Todas as amostras submetidas amplificaram na PCR utilizando os oligonucleotídeos do Domínio Bacteria. As identificações podem ser vistas na Tabela 6.

Tabela 6 – Identificações das amostras através dos oligonucleotídeos que amplificam o gene 16S rDNA Domínio Bacteria

N	Local	Amostra	Identificação	Similaridade da sequência	Nº de Genbank comparado	
1	Parque Farroupilha	Fonte	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	93%	MG859645.1	
2		Lago 1	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	96%	KR002424.1	
3		Lago 2	<i>Chryseobacterium</i> sp.	89%	AP014624.1	
4	HSC	Balde	<i>Pseudomonas</i> sp.	84%	JQ319656.1	
5		UTI	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	95%	KR002424.1	
6		CME	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	96%	KR002424.1	
7		S.F.	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	96%	KR002424.1	
8		CTI	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	86%	KY426365.1	
9		UTIP	Positivo para Domínio Bacteria	N.I.	-	
10		Emergência	<i>Variovorax paradoxus</i>	92%	JQ291591.1	
11		C.E.	<i>Bosea vestrisii</i>	96%	MF045146.1	
12		HCPA	CH UIP	Positivo para Domínio Bacteria	N.I.	-
13			EXP UIP	<i>Variovorax paradoxus</i>	95%	JQ291591.1
14			CTI 2	<i>Variovorax paradoxus</i>	82%	JQ291591.1
15	Isolamento		<i>Sphingomonas</i> sp.	88%	AJ746106.1	
16	PED BBD		Positivo para Domínio Bacteria	N.I.	-	
17	UTIP A1		<i>Sphingomonas trueperi</i>	81%	NR_113897.1	
18	UTIP A2		Positivo para Domínio Bacteria	N.I.	-	
19	CH BB		<i>Sphingomonas</i> sp.	91%	KF420393.1	
20	ENF HM		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	94%	MG450363.1	
21	HM BBD		<i>Sediminibacterium</i> sp.	92%	FJ915149.1	
22	NUTR CTI	Positivo para Domínio Bacteria	N.I.	-		

N.I.- Não identificado

Das 22 amostras submetidas a identificação molecular através da PCR utilizando oligonucleotídeos bacterianos específicos foram identificadas 11 (50,0%) amostras com *Pseudomonas* spp. e 6 (27,2%) amostras com *Mycobacterium* spp., tanto nas amostras do Parque Farroupilha quanto dos hospitais. Em nenhuma amostra foi identificada a presença de *Legionella* spp. (Tabela 7).

Tabela 7 – Identificação de BRA nas amostras coletadas através de reações de PCR utilizando oligonucleotídeos gênero-específicos

N	Local	Amostra	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>Legionella</i> spp.	
1	Parque Farroupilha	Fonte	-	-	-	
2		Lago 1	+	+	-	
3		Lago 2	+	+	-	
4	HSC	Balde	+	+	-	
5		UTI	+	+	-	
6		CME	+	-	-	
7		S.F.	+	-	-	
8		CTI	-	-	-	
9		UTIP	+	-	-	
10		Emergência	-	+	-	
11		C.E.	+	-	-	
12		HCPA	CH UIP	-	-	-
13			EXP UIP	-	-	-
14			CTI 2	-	+	-
15	Isolamento		-	-	-	
16	PED BBD		-	-	-	
17	UTIP A1		+	-	-	
18	UTIP A2		+	-	-	
19	CH BB		-	-	-	
20	ENF HM		-	-	-	
21	HM BBD		+	-	-	
22	NUTR CTI	-	-	-		

5.3 Culturômica

Foram identificados 13 diferentes micro-organismos em 9 amostras utilizando-se a culturômica. Alguns micro-organismos estavam presentes em mais de uma amostra, conforme Tabela 8.

Tabela 8 – Micro-organismos identificados pela culturômica

N	Micro-organismo identificado	Escore no MALDI-TOF Biotyper	Amostra
1	<i>Achromobacter spanius</i>	1.92	UTIP A2
2	<i>Candida guilliermondii</i>	>2.31	Emergência, CTI, C.E.
3	<i>Candida intermedia</i>	>2.22	UTIP, CTI, C.E.
4	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	>2.22	Fonte, Lago 2
5	<i>Delftia acidovorans</i>	2.37	Lago 1, Lago 2
6	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	2.2	UTIP A2
7	<i>Micrococcus luteus</i>	>2.41	Fonte, CH UIP
8	<i>Pandoraea sputorum</i>	2.34	Lago 2
9	<i>Rhizobium radiobacter</i>	2.42	CH BB
10	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	>2.05	Fonte, Lago 1, Lago 2
11	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2.26	Fonte
12	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2.53	UTIP A2
13	<i>Variovorax paradoxus</i>	1.72	Emergência

6. DISCUSSÃO

O presente estudo buscou implementar as técnicas de cocultura e enriquecimento amebiano no Laboratório de Parasitologia da UFRGS, investigando a diversidade de MRA e seus possíveis hospedeiros amebianos em águas de origem antropogênica externa e em ambiente nosocomial. Nossos resultados mostraram a presença de micro-organismos resistentes à *A. castellanii* em todas as amostras submetidas à cocultura. Já na técnica de enriquecimento amebiano, que busca isolar AVL das amostras coletadas, foi verificada a presença de 47,8% de AVL nas 23 amostras analisadas.

A taxa média de detecção de AVL em estudos de água de diversos países é de 45%, mas altamente variável devido a diferenças de métodos de identificação e do tipo de amostra de água analisada (THOMAS; ASHBOLT, 2011). No presente trabalho, através da técnica de enriquecimento amebiano, 47,8% das amostras foram positivas para AVL, isoladas das amostras do Parque Farroupilha: Fonte, Lago 1, Lago 2 e Espelho; do HSC: CTI, UTIP, Emergência e C.E.; e do HCPA: CTI 2, Isolamento e HM BBD. Essa técnica realizada em associação à cocultura amebiana, permite que se estabeleça um paralelo entre os micro-organismos encontrados na cocultura com as AVL das amostras. Nas amostras analisadas, detectamos a presença de *Naegleria* spp., *Vermamoeba vermiformis* e principalmente *Acanthamoeba* spp. resultado este semelhante ao encontrado no estudo de Garcia et al. (2013), onde a maioria dos isolados de água em ambiente hospitalar pertenciam a espécies do gênero *Acanthamoeba*, seguido de *V. vermiformis* e *Naegleria* spp. Além disso, como utilizamos oligonucleotídeos somente para AVL potencialmente patogênicas, há possibilidade de outras amebas de vida livre estarem presentes.

Acanthamoeba spp. foi identificada em todas as amostras através do enriquecimento amebiano, exceto na amostra Fonte. Esse gênero amebiano é um dos mais identificados em amostras ambientais e clínicas e, por possuir alta resistência a condições desfavoráveis, representa um risco à saúde especialmente se apresentar micro-organismos patogênicos internalizados (GREUB; RAOULT, 2004; GARCIA et al., 2013), como *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Mycobacterium* spp., entre outras espécies patogênicas já relatadas como MRA (CATEAU et al., 2011;

BALCZUN; SCHEID, 2017).

O gênero *Naegleria* foi identificado em cinco amostras: Fonte, Lago 2, Espelho, CTI e ISO. No teste de exflagelação foi possível a identificação de *N. fowleri* nas amostras Fonte e Isolamento. A espécie *N. fowleri* é conhecida por ser uma AVL patogênica causadora de meningoencefalite amebiana primária (MAP) tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto hígidos (DE CARLI; MOURA, 2001). Apesar de ser uma doença considerada rara, os casos da doença em humanos são relacionados a crianças e jovens adultos com histórico de nadar em lagos, córregos, piscinas de água doce ou até mesmo pela aspiração de água corrente proveniente de torneiras, contendo estas amebas (VISVESVARA, 2010). Além disso, espécies do gênero *Naegleria* podem servir de reservatórios para dispersão e multiplicação de micro-organismos, incluindo espécies patogênicas, representando uma ameaça adicional à saúde humana (GREUB; RAOULT, 2004). Os trabalhos de Rowbotham et al. (1980), Thomas et al. (2008) e Boamah et al. (2017) já descreveram *Naegleria* spp. como hospedeira de diversas bactérias, como espécies do gênero *Legionella*, incluindo *L. pneumophila*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acidovorax temperans*, *Flavobacterium johnsoniae*.

Durante o verão, devido à elevação da temperatura, a proliferação de *N. fowleri* aumenta e conseqüentemente é o período que os riscos de ocorrência de MAP também aumentam (VISVESVARA, 2010). A Fonte do Parque Farroupilha é um local onde algumas crianças e animais domésticos costumam se banhar durante essa época do ano. Os primeiros e únicos relatos encontrados de MAP envolvendo *Naegleria* no Brasil foram publicados por Salles-Gomes Jr (1978) e Carvalho et al. (1983), não sendo encontrado na literatura casos mais recentes da doença, podendo ser devido à não ocorrência ou à falta de diagnóstico correto. Desta forma, é possível afirmar que existe o risco de infecção por este micro-organismo nesse local. Já a água proveniente da torneira do Isolamento do HCPA, de onde *N. fowleri* também foi isolada, é usada principalmente pelos funcionários do hospital. Acredita-se que, apesar da presença dessa AVL ser um fator de risco, se as normas de biossegurança existentes em quartos de isolamento, que costumam ser mais rígidas do que em outros ambientes hospitalares, forem obedecidas, o risco MAP por *N. fowleri* seja menor, mesmo considerando que pacientes internados em áreas de isolamento

apresentem a imunidade comprometida.

Vermamoeba vermiformis foi identificada nas amostras Lago 1, Lago 2, Espelho, UTIP, Emergência e HM BBD. Em seus estudos, Wang et al. (2012), Coşkun et al. (2013) e Muchesa et al. (2017) também obtiveram *V. vermiformis* em amostras de água da torneira, corroborando com os achados do nosso estudo. Anteriormente chamada *Hartmannella vermiformis*, alguns estudos relacionaram essa espécie a casos de ceratite amebiana, com ou sem coinfeção com *Acanthamoeba* spp. (INOUE et al., 1998; LORENZO-MORALES et al., 2007; ABEDKHOJASTEH et al., 2013). Além disso, *V. vermiformis* também é responsável por transportar diversos micro-organismos, alguns desses patógenos humanos, como *Bacillus anthracis*, *L. pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Mycobacterium* spp. e espécies da ordem Chlamydiales (CATEAU et al., 2008; WHEAT et al., 2014; PAGNIER et al., 2015; BALCZUN; SCHEID, 2017; DELAFONT et al., 2018).

Foi constatado a efetividade da cocultura, já que todas as amostras apresentaram bactérias capazes de resistir à fusão lisossomal de *A. castellanii*, como pode ser visto através da amplificação do gene 16S rDNA (Domínio Bacteria) em todas as amostras. As lavagens e o uso de antibiótico durante todo o processamento da amostra asseguram que as bactérias encontradas foram internalizadas na ameba hospedeira após o período de incubação. Apesar do experimento *in vitro* apresentar alta efetividade, a prevalência de micro-organismos internalizados e resistentes à AVL no meio ambiente é variável. Em pesquisa realizada por Maschio et al. (2015) a presença de *Pseudomonas* spp. foi verificada em todos os 12 isolados de *Acanthamoeba* spp., provenientes de estojos de lente de contato e ar condicionado que foram analisados. Já Choi et al. (2009) encontraram 29,4% de micro-organismos internalizados em 17 isolados de *Acanthamoeba* spp. provenientes de água da torneira, enquanto Schmitz-Esser et al. (2008) verificaram que de 10 isolados de *Acanthamoeba* spp. de origem ambiental, 8 (80%) possuíam algum micro-organismo internalizado. Essa variação encontrada pode estar ligada tanto à espécie do hospedeiro amebiano, como às variações ambientais.

Os resultados obtidos na culturômica indicam que esse método é um bom complemento à técnica de PCR convencional para identificação de MRA em amostras ambientais. Como a cocultura amebiana possibilita a identificação de

micro-organismos fastidiosos ou incultiváveis, a culturômica, por utilizar um meio rico com tempo de incubação longo, pode fornecer melhores condições para estes micro-organismos se multiplicarem e posteriormente crescerem em meios de cultivo.

Conforme mencionado por Greub (2012), o método da culturômica permite a detecção de populações menos abundantes. Isto não ocorre em reações convencionais de PCR, mesmo ao utilizar oligonucleotídeos universais, pois esse tipo de técnica molecular permite detectar apenas o micro-organismo que estava mais abundante na amostra. Uma estratégia a ser considerada é a implementação da metagenômica, que permite a detecção de diversos genomas, juntamente com a culturômica, na realização da cocultura amebiana para identificação de MRA em amostras ambientais. Como as AVL auxiliam no crescimento de bactérias incultiváveis e fastidiosas, a utilização desses dois métodos aumentaria a eficiência dos estudos da diversidade de micro-organismos ambientais, assim como se tem visto nos estudos de microbiota intestinal humana. Além disso, poderia proporcionar o descobrimento de novas espécies e a realização de novos estudos de interação ecológica entre MRA-AVL.

O meio de pré-incubação utilizado na culturômica que foi usado no presente trabalho foi adaptado de Tandina et al. (2016), cujo estudo utilizava esse meio para crescimento de bactérias em amostras de água de reprodução de mosquitos selvagens e de laboratório. Esse meio rico mostrou ser adequado para estudos utilizando amostras de água, permitindo crescimento bacteriano em placas de ágar Mueller Hinton enriquecidos com sangue. Entretanto, para pesquisas envolvendo MRA, mais estudos utilizando novos meios de pré-incubação e condições de crescimento devem ser realizados.

Através da PCR foi possível identificar a espécie *Chryseobacterium indologenes* nas amostras Fonte, Lago 1, UTI, CME e S.F. O gênero bacteriano *Chryseobacterium* também foi identificado por PCR na amostra Lago 2. Pela culturômica também foi possível isolar e identificar *C. indologenes* nas amostras Lago 1 e Lago 2, confirmando os resultados obtidos pela PCR. Esse gênero bacteriano Gram negativo é encontrado comumente no ambiente e muitas de suas espécies, incluindo a espécie *C. indologenes*, são oportunistas, causando pneumonia, meningite, endocardite, peritonite, infecções oculares e infecções na pele normalmente associados a pessoas imunocomprometidas e pacientes que

estão internados há muito tempo e/ou utilizam equipamentos médicos de longa permanência, como catéteres (LIN et al., 2010; SUDHARANI; ASIYA, 2011; WANG et al., 2014; AYKAC et al., 2016; BEATO et al., 2016; MUKERJI et al., 2016; GONZÁLEZ-CASTRO et al., 2017). A identificação de *Chryseobacterium* spp. através da cocultura amebiana utilizando *A. polyphaga* foi realizada por Greub et al. (2004) em amostras clínicas e, em amostras de água, *C. indologenes* foi identificado por Pagnier et al. (2008). Utilizando como hospedeiro *A. castellanii*, mesma espécie do presente trabalho, Thomas et al. (2008) identificaram *Chryseobacterium* spp. em amostras de estações de tratamento de água.

Através da culturômica, também foi identificada a espécie *Elizabethkingia meningoseptica*, um bacilo Gram negativo oportunista, na UTIP Área 2. Essa espécie é semelhante morfológicamente com *C. indologenes* e possui os mesmos relatos de doenças, incluindo estudos relacionando a espécie à contaminação da água do hospital (MOORE et al., 2016; FILHO et al., 2017). Não foi encontrado nenhum outro estudo relacionando *E. meningoseptica* como MRA de *Acanthamoeba* spp. ou outra espécie de AVL.

Através da culturômica também foi encontrado nas amostras Fonte e CH BB a espécie *Micrococcus luteus*, um coco Gram positivo aeróbio obrigatório que pode ser encontrado em diversos tipos de ambiente, como pele, poeira e água (SZYMAŃSKA, 2007). Há relatos clínicos, de ocorrência rara, relacionando essa espécie a casos de endocardite, bacteremia, meningite e infecções cutâneas em pessoas imunocomprometidas (FOSSE et al., 1985; VON EIFF et al., 1996; SMITH et al., 1999; MILTIADOUS; ELISAF, 2011). Nenhum estudo relatando a identificação dessa espécie bacteriana através da cocultura amebiana em amostras ambientais foi encontrado. Sua interação com AVL foi abordada apenas em relação à predador-presa de *A. castellanii* com *M. luteus*, demonstrando interação positiva no crescimento dos trofozoítos e na recuperação de cistos amebianos em cultura monoxênica com esta espécie bacteriana (MORAES; ALFIERI, 2008). Weekers et al. (1993) demonstraram que diferentes isolados de *Acanthamoeba* podem ter diferentes preferências predatórias e, levando em consideração que no presente trabalho *M. luteus* foi identificado em duas amostras através da culturômica, sugere-se que, se essa espécie bacteriana encontrava-se em um ambiente com isolados amebianos com preferência alimentar por *M. luteus*, ela poderia ter desenvolvido resistência à fusão

lisossomal após fagocitose pelas amebas, como uma estratégia de sobrevivência, evitando ter sua população reduzida no ambiente.

Nas amostras Lago 1 e Lago 2, ambas do Parque Farroupilha, foi identificada a espécie *Delftia acidovorans* através do método de culturômica, um bacilo Gram negativo ambiental amplamente distribuído que nos últimos anos tem atraído atenção nos estudos clínicos, relacionando casos de bacteremia, úlcera de córnea, pneumonia nosocomial e empiemas, inclusive em imunocompetentes (KAWAMURA et al., 2011; KHAN et al., 2012; TAŞ et al., 2012; BILGIN et al., 2015). *D. acidovorans* já foi encontrada em amostras ambientais de solo através da cocultura amebiana utilizando *A. polyphaga* (EVSTIGNEEVA et al., 2009) e em associação com *V. vermiformis* em amostras de água em ambiente hospitalar (MUCHESA et al., 2017). Não foi encontrado nenhum estudo relacionando *D. acidovorans* com *A. castellanii*, podendo ser nosso estudo o primeiro relatando a interação entre essas duas espécies.

Stenotrophomonas maltophilia, um bacilo Gram negativo oportunista, foi identificado por culturômica na amostra UTIP Área 2 e por PCR na amostra da Enfermaria da Hemodinâmica, ambas do HCPA. Essa espécie está relacionada a surtos hospitalares, principalmente a paciente imunocomprometidos. A infecção pode ocorrer por ingestão, aerossóis, inalação ou pelas mãos dos profissionais de saúde (CATEAU et al., 2014b). Os trabalhos de Corsaro et al. (2013) e Muchesa et al. (2017) mencionam a ocorrência de *S. maltophilia* em *Acanthamoeba*, *Naegleria* e *Vermamoeba vermiformis*, enquanto Cateau et al. (2014a) demonstraram que presença de *V. vermiformis* pode aumentar o crescimento de *S. maltophilia*. Como identificamos *S. maltophilia* em ambiente hospitalar e há relatos de interação com diversos gêneros amebianos, o risco de contaminação por essa bactéria existe, principalmente porque as AVL proporcionariam proteção à bactéria auxiliando na sua disseminação.

Variovorax paradoxus encontrada através da culturômica na Emergência do HCPA, mesmo apresentando um escore baixo, também foi identificada pela cocultura utilizando a amplificação do gene 16S rDNA do Domínio Bacteria para a mesma amostra. Além da amostra da Emergência, através da amplificação do mesmo gene por PCR, foi possível identificar a mesma espécie nas amostras Expurgo UIP e CTI 2, ambas do HCPA. Essa bactéria é um bacilo Gram negativo, presente em ambientes aquáticos, conhecida por ser um

fitopatígeno e por estar associado a importantes processos catabólicos, incluindo a degradação de compostos químicos tóxicos e/ou complexos (SATOLA et al., 2013). Estudos relacionaram *V. paradoxus* como endossimbionte da ameba *Arcella rotundata* (TÖRÖK et al., 2008), *Acanthamoeba* spp. (HEWETT, 2006) e *Saccamoeba limax* (CORSARO et al., 2010).

Nas amostras Isolamento e CH BB, ambas do HCPA, identificou-se *Sphingomonas* spp. e na amostra da UTIP Área 1, também do HCPA, foi identificada a espécie *Sphingomonas trueperi*. Esse bacilo Gram-negativo já foi reportado anteriormente em amostras de água da torneira por Marciano-Cabral et al. (2010). Clinicamente, a espécie *Sphingomonas paucimobilis* possui maior importância, pois já foi associada a doenças em pessoas imunocomprometidas e imunocompetentes, como bacteremia, pneumonia associada à ventilação mecânica e meningite (HSUEH et al., 1998; PEROLA et al., 2002; MEHMOOD et al., 2018). Evstigneeva et al. (2009) identificaram *Sphingomonas* sp. ao realizar cocultura amebiana utilizando *A. polyphaga* para amostras de solo, verificando o crescimento bacteriano no interior da ameba. Além desse trabalho, Muchesa et al. (2017) identificaram *S. paucimobilis* internalizadas em *V. vermiformis* em amostra de água de ambiente hospitalar. Nenhum estudo relacionando *S. trueperi* com espécies de AVL foi encontrado. Possivelmente o presente estudo seja o primeiro a relatar a interação entre essas duas espécies.

Bradyrhizobium spp., encontrado na amostra coletada na CTI do HSC, são bacilos Gram negativos, associadas a amostras ambientais, principalmente em solo e seus estudos envolvem fixação de nitrogênio (KALITA; MAŁEK, 2010). Pagnier et al. (2008) e La Scola et al. (2002) também identificaram esse gênero através da cocultura com *Acanthamoeba* spp. em amostras de água em ambiente hospitalar. Muchesa et al. (2017) e Thomas et al. (2006) encontraram internalizada em *V. vermiformis*. Além disso, *Bradyrhizobium* spp. foi identificada em estudos sobre pneumonia e sua ligação com bactérias presentes em ventilação mecânica (LA SCOLA et al., 2003a; BERGER et al., 2006), entretanto sua patogenicidade é desconhecida para avaliarmos os riscos da presença dessa bactéria na CTI.

Bosea vestrisii, identificada no C.E. do HSC, é uma bactéria Gram negativa fastidiosa descoberta por La Scola et al. (2003b) em amostras de água em ambiente hospitalar, através da cocultura amebiana com *A. polyphaga*. No estudo de La Scola et al. foi sugerida a possibilidade dessa espécie ser

responsável por casos não diagnosticados de infecções pulmonares adquiridas em hospitais. Essa mesma espécie já foi encontrada em amostras ambientais não-hospitalares, como no estudo de Thomas et al. (2008), onde identificaram a mesma espécie em cocultura com *A. castellanii* em amostras coletadas em um rio. A identificação dessa espécie no presente trabalho através da cocultura mostra a eficiência da técnica na identificação de bactérias fastidiosas, confirmando estudos anteriores que mencionam a sensibilidade da técnica de cocultura para micro-organismos fastidiosos (GREUB; RAOULT, 2004).

Através da culturômica, foi encontrada na UTIP Área 2, a espécie *Achromobacter spanius*. Entretanto, seu score foi de 1.92, indicando uma provável identificação do gênero e espécie conforme similaridade no banco de dados. *A. spanius* é um coco Gram negativo, considerado raro pois poucas cepas foram encontradas e sua patogenicidade para saúde humana é pouco relatada (COENYE et al., 2003). Nenhum estudo foi encontrado relacionando *A. spanius* com AVL, apenas outras espécies do gênero foram vistas em associação com AVL ou identificadas através da cocultura amebiana (GREUB et al., 2004; MUCHESA et al., 2017).

Rhizobium radiobacter foi identificada através da culturômica no CH BB. A amostra foi coletada de torneiras monocomando chuveirinho, utilizada para lavagens de mãos e equipamentos e para dar banho nos bebês internados. Essa espécie é um bacilo Gram negativo oportunista relacionado à endocardite por prótese valvar, bacteremia, peritonite, endoftalmite e pneumonia (GUERRA et al., 2013; MISRA et al., 2014; AL-ABDULLAH et al., 2015; TIWARI; BERIHA, 2015; CHANZÁ et al., 2017). Saisongkorh et al. (2010) mostraram que *R. radiobacter* sobreviveu junto com *Bartonella rattaustaliani*, no interior de *A. polyphaga* tendo havido transmissão de genes de *B. rattaustaliani* para *R. radiobacter* através de conjugação. Já Delafont et al. (2013) identificaram *Rhizobium* spp. internalizados em AVL em amostra de água.

Na amostra Lago 2, do Parque Farroupilha, foi encontrada *Pandoraea sputorum* através da culturômica. Esse bacilo Gram negativo é um patógeno oportunista relacionado a casos de fibrose cística (PIMENTEL; MACLEOD, 2008; MARTINA et al., 2017). *Pandoraea* spp. já foi reportado internalizado em AVL em amostras de água (DELAFONT et al., 2013).

Nas amostras do Parque Farroupilha, foi identificado por culturômica

Staphylococcus haemolyticus na amostra Fonte e *Staphylococcus epidermidis* nas amostras Fonte, Lago 2 e Lago 1. Ambas as espécies são Gram positivas e pertencentes à microbiota humana. Entretanto, nos últimos anos foi relatado a incidência de infecções por essas bactérias, sendo *S. epidermidis* predominantemente isolado, principalmente de cateteres e materiais protéticos e em pacientes imunodeprimidos, seguido de *S. haemolyticus*, segunda espécie mais prevalente, relacionada a endocardites, sepse, peritonite, etc. (OTTO, 2009; BECKER et al., 2014; PINHEIRO et al., 2015). Muchesa et al. (2017) identificaram *S. epidermidis* internalizado em AVL em amostras de água em ambiente hospitalar. Não foram encontrados estudos relacionando *S. haemolyticus* à AVL, seja em cocultura ou como endossimbionte de isolados amebianos.

Foram identificadas *Pseudomonas* spp. na amostra Balde utilizando os oligonucleotídeos do Domínio Bacteria e em 11 (50,0%) amostras, Lago 1, Lago 2, Balde, UTI, CME, S.F., UTIP, C.E., UTIP Área 1, UTIP Área 2 e HM BBD, com os oligonucleotídeos específicos para o gênero *Pseudomonas*. *Pseudomonas* spp. são bacilos Gram negativos encontrados em diversos ambientes, incluindo a água. Possui espécies patogênicas oportunistas, como *P. aeruginosa* e *P. putida*, que causam bacteremia, pneumonia crônica em pacientes com fibrose cística, infecções na pele e em outros tecidos, etc., normalmente em pacientes imunocomprometidos e que utilizam equipamento de longa duração, como cateteres (SPILKER et al., 2004; THOMAS et al., 2013). Esse gênero bacteriano é um dos mais encontrados internalizado em AVL, como *Acanthamoeba* spp. e *V. vermiformis* e identificado e/ou isolado através da cocultura amebiana em amostras ambientais (THOMAS et al., 2006; CATEAU et al., 2008; WANG et al., 2012; GARCIA et al., 2013; MASCHIO et al., 2015; MUCHESA et al., 2017; SOARES et al., 2017).

As amostras Lago 1, Lago 2, Balde, UTI, Emergência, CTI 2 foram positivas para *Mycobacterium* spp. através da PCR utilizando os oligonucleotídeos específicos para esse gênero. *Mycobacterium* spp. são bacilos álcool-ácido resistentes, possuindo espécies patogênicas como *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. leprae*, causadoras de tuberculose humana, tuberculose humana/bovina e hanseníase, respectivamente. Há também espécies consideradas oportunistas, como no caso de *M. avium*, com patologias extremamente variáveis (BASILLE et al., 2018) e as chamadas micobactérias não tuberculosas (MNT), que são

bactérias ambientais que podem ser associadas a algumas doenças em humanos, transmitidas inclusive por sistemas de água (PRIMM et al., 2004). Já foi avaliado *in vitro* a capacidade de sobrevivência à internalização de diferentes espécies de micobactérias patogênicas e MNT em trofozoítos e cistos de AVL, inclusive já foi relatado a capacidade de multiplicação dessas bactérias dentro da ameba e o aumento de virulência após internalização amebiana (CIRILLO et al., 1997; ADÉKAMBI et al., 2006; SALAH et al., 2009; MEDIE et al., 2011; WHEAT et al., 2014). Várias espécies do gênero *Mycobacterium* já foram encontradas através da cocultura amebiana, tanto em amostras ambientais quanto clínicas e, independente da espécie de micobactéria, águas contaminadas, incluindo as domésticas, têm sido indicadas como uma fonte ambiental de várias doenças micobacterianas (YU et al., 2007; WANG et al., 2012; CABELLO-VÍLCHEZ et al., 2014; GARCIA et al., 2013; OVRUTSKY et al., 2013; DELAFONT et al., 2014; SAMBA-LOUAKA et al., 2018).

No estudo realizado por Thomas et al. (2006) houve uma evidente associação entre a presença de AVL e de várias espécies de micobactérias não tuberculosas em amostras de água de origem hospitalar. A equipe isolou micobactérias com maior frequência em amostras onde também havia se isolado AVL (7/15 amostras, 46,7%) do que em amostras sem a presença de AVL (34/185, 18.4%), sugerindo também uma alta taxa de multiplicação das micobactérias durante a cocultura. Essa relação de presença de micobactérias em amostras com presença de AVL também ocorreu no presente trabalho, onde das 6 amostras positivas para *Mycobacterium* spp, 4 (66,6%) eram positivas para AVL.

Sediminibacterium sp. foi identificada na amostra do bebedouro da Hemodinâmica. Essa espécie é um bacilo Gram negativo, normalmente identificado em amostras de água, solo e em amostras clínicas de abscessos hepáticos e dermatites atópicas, apesar de sua patogenicidade ainda permanecer desconhecida (QU; YUAN, 2008; WU et al., 2014; REYNA-FABIÁN et al., 2016; KIM et al., 2017). Delafont et al., (2016) identificou *Sediminibacterium* sp. internalizado em *V. vermiformis* em amostras de água da torneira. Outros trabalhos com cocultura amebiana não foram encontrados.

Através da culturômica *Candida guilliermondii* nas amostras Emergência, CTI e C.E. e *Candida intermedia* nas amostras UTIP, CTI e C.E foram encontradas. Essas espécies de fungos são consideradas patogênicas

oportunistas de difícil tratamento, sendo relatadas inclusive em infecções hospitalares (PFALLER et al., 2006; BADIEE et al., 2017). Apesar do presente trabalho não ter usado antifúngicos para evitar crescimento extracelular amebiano, a associação dessas espécies de *Candida* com *A. castellanii* é um dado inédito a ser estudado, tendo em vista que nenhum outro trabalho utilizando cocultura amebiana ou identificação de endossimbiontes em AVL foram encontrados. Vanessa et al. (2012) mostraram que *V. vermiformis* era capaz de internalizar e otimizar o crescimento de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* e que, sem a ameba como proteção, a água da torneira não era um meio apropriado para crescimento das leveduras. Como as amostras do presente estudo foram provenientes de água da torneira, acredita-se que as espécies de *Candida* encontradas estavam internalizadas em AVL no momento da coleta e permaneceram viáveis devido à cocultura com *A. castellanii* até o momento de cultivo no meio de pré-incubação da culturômica.

As amostras coletadas do hospital foram todas oriundas de água tratada pela rede de tratamento das respectivas cidades. A identificação dessas espécies no presente trabalho demonstra a resistência desses micro-organismos ao tratamento convencional da água. Além disso, micro-organismos internalizados em AVL não sofrem ação dos agentes químicos utilizados para o tratamento da água, pois as amebas servem como uma “armadura” para proteção (GREUB; RAUOLT, 2004). Esta proteção foi testada por Miltner e Bermudez (2000) avaliando a susceptibilidade de *M. avium* a antibióticos quando internalizados em *A. castellanii*. O resultado foi o crescimento da bactéria no interior da ameba, sem ser afetada pelos antibióticos testados. Esses dados inferem uma maior resistência das bactérias aos tratamentos da água no ambiente e aos tratamentos com antimicrobianos.

São necessários futuros estudos de interação utilizando os micro-organismos encontrados na cocultura com as espécies de AVL encontradas no enriquecimento amebiano para melhor compreensão ecológica da possível interação, já que há variação da resistência dos micro-organismos às AVL de acordo com o hospedeiro amebiano (EVSTIGNEVA et al., 2009), bem como para avaliar a influência na virulência desses micro-organismos após interação e seu possível impacto à saúde, especialmente no ambiente hospitalar. Consequentemente, como foi utilizada apenas *A. castellanii* como espécie

hospedeira na cocultura, o presente trabalho não apresenta uma cobertura completa da diversidade total das AVL e seus micro-organismos associados, sendo necessária a realização de cocultura utilizando a AVL predominante no ambiente e/ou realizar coculturas com diferentes gêneros amebianos para a mesma amostra.

Pagnier et al. (2008) demonstraram em seu estudo a capacidade lítica de diversos isolados bacterianos através da cocultura amebiana utilizando *A. polyphaga*. Alguns isolados daquele estudo são dos mesmos gêneros ou espécies encontradas no presente trabalho, como *Chryseobacterium* spp, *Pseudomonas* spp., *Bradyrhizobium* spp., *Mycobacterium* spp. e *Delftia acidovorans*, os quais no trabalho de Pagnier et al. demonstraram alguma habilidade lítica na ameba, seja parcial ou total. Essa habilidade lítica não ocorreu em cocultura com *A. castellanii* realizada no presente trabalho em nenhuma das amostras que continham esses micro-organismos. Tal ocorrência pode ser devida ao fato das amostras conterem diversos micro-organismos, o que corroboraria com o estudo de Slimani et al., (2013) que demonstrou que algumas vezes os simbiotes das amebas são líticos para as mesmas em condições de cultura *in vitro*, mas que o mesmo pode não ocorrer quando várias espécies infectam a ameba.

Finalmente, a presente pesquisa demonstrou sucesso na implementação dos métodos de cocultura e enriquecimento amebiano, possibilitando que novos estudos sejam realizados. Nosso trabalho é pioneiro no Brasil utilizando os métodos de cocultura amebiana, enriquecimento amebiano e culturômica para identificação de micro-organismos em amostras de água de origem antropogênica externa e de ambiente nosocomial. Além disso, nossos dados trazem associações com novos micro-organismos que não haviam sido descritos anteriormente como MRA de *A. castellanii* e das AVL encontradas no enriquecimento amebiano. As análises realizadas podem servir como base para futuros estudos envolvendo esses micro-organismos, para determinação de sua capacidade de resistir às AVL bem como suas consequências para o meio.

7. CONCLUSÃO

Os métodos de cocultura e enriquecimento amebiano foram implementadas com sucesso no Laboratório de Parasitologia da UFRGS, proporcionando a identificação AVL e MRA dos ambientes em que foram realizadas as coletas.

A maioria das bactérias identificadas eram Gram negativas e patogênicas oportunistas ao ser humano, tendo sido possível identificar *Bosea vestrisii*, espécie bacteriana fastidiosa através da cocultura. A maioria das AVL encontradas quando se utilizou o enriquecimento amebiano pertenciam ao gênero *Acanthamoeba*, seguido de *V. vermiformis* e *Naegleria* spp. A utilização da culturômica com MALDI-TOF MS mostrou-se efetiva para identificação de MRA em amostras ambientais.

Até onde foi possível avaliar a literatura, este trabalho foi o primeiro a utilizar os métodos de cocultura e enriquecimento amebiano, complementados com a culturômica, para avaliação microbiológica de amostras de água de origem antropogênica externa e nosocomial. Os resultados das identificações do presente trabalho, com algumas associações entre AVL-MRA inéditas na literatura, servem como referência para novos estudos. Além disso, a implementação dos dois métodos abre um leque de possibilidades de estudos a serem desenvolvidos no laboratório de Parasitologia, assim como em prestações de serviços.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Identificar os possíveis micro-organismos internalizados nas amebas isoladas pelo método de enriquecimento amebiano.

Aplicar as técnicas utilizadas no presente trabalho em outros tipos de amostras ambientais, assim como utilizar outras espécies de amebas como hospedeiras na aplicação da cocultura amebiana.

9. REFERÊNCIAS

- Abedkhozasteh H, Niyyati M, Rahimi F, Heidari M, Farnia S, Rezaeian M. 2013. First report of *Hartmannella* keratitis in a cosmetic soft contact lens wearer in Iran. *Iran J Parasitol* 8:481–485
- Adékambi T, Salah SB, Khelif M, Raoult D, Drancourt M. 2006. Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5974–81.
- Al-Abdullah AA, Al-Falah M, Al-Rashaed S, Khandekar R, Arevalo JF. 2015. Endophthalmitis Caused by *Rhizobium radiobacter* After Posterior Chamber Phakic Intraocular Lens Implantation to Correct Myopia. *J Refract Surg.* Aug;31(8):561-3.
- Amrane S, Raoult D, Lagier JC. 2018. Metagenomics, culturomics, and the human gut microbiota. *Expert Rev Anti Infect Ther.* May;16(5):373-375.
- Andreani J, Khalil JYB, Sevvana M, Benamar S, Di Pinto F, Bitam I, Colson P, Klose T, Rossmann MG, Raoult D, La Scola B. 2017. Pacmanvirus, a New Giant Icosahedral Virus at the Crossroads between Asfarviridae and Faustoviruses. McFadden G, ed. *Journal of Virology.* 91(14):e00212-17.
- Axelsson-Olsson D, Waldenström J, Broman T, Olsen B, Holmberg M. 2005. Protozoan *Acanthamoeba polyphaga* as a Potential Reservoir for *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology.* 71(2):987-992.
- Aykac K, Ozsurekci Y, Tuncer O, Sancak B, Cengiz AB, Kara A, Ceyhan M. 2016. Six cases during 2012-2015 and literature review of *Chryseobacterium indologenes* infections in pediatric patients. *Can J Microbiol.* Oct;62(10):812-819.
- Azhar EI, Papadioti A, Bibi F, Ashshi AM, Raoult D, Angelakis E. 2017a. “*Pseudomonas saudimassiliensis*” sp. nov. a new bacterial species isolated from air samples in the urban environment of Makkah, Saudi Arabia. *New Microbes and New Infections.* 16:43-44.
- Azhar EI, Papadioti A, Bibi F, Ashshi AM, Raoult D, Angelakis E. 2017b. “*Pseudomonas saudiphocaensis*” sp. nov., a new bacterial species isolated from currency notes collected during the Hajj pilgrimage in 2012 at Makkah, Saudi Arabia. *New Microbes and New Infections.* 15:131-133.
- Badiee P, Badali H, Boekhout T, Diba K, Moghadam AG, Hossaini Nasab A, Jafarian H, Mohammadi R, Mirhendi H, Najafzadeh MJ, Shamsizadeh A, Soltani J. 2017. Antifungal susceptibility testing of *Candida* species isolated from the immunocompromised patients admitted to ten university hospitals in Iran: comparison of colonizing and infecting isolates. *BMC Infectious Diseases.* 17:727.
- Balczun C, Scheid P. 2017. Free-Living Amoebae as Hosts for and Vectors of Intracellular Microorganisms with Public Health Significance. *Viruses* 9(4). pii: E65.
- Basille D, Jounieaux V, Andréjak C. 2018. Treatment of Other Nontuberculous Mycobacteria. *Semin Respir Crit Care Med.*39(3):377-382.
- Beato JN, Espinar MJ, Figueira L, Eremina YO, Ribeiro M, Moreira R, Falcão-Reis F. 2016. *Elizabethkingia meningoseptica* and Contact Lens Use. *Acta Med Port.* Apr;29(4):287-9.
- Becker K, Heilmann C, Peters G. 2014. Coagulase-Negative Staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews.*27(4):870-926.

- Belkacemi S, Cassir N, Delerce J, Cadoret F, La Scola B. 2018a. "*Bacteroides cutis*," a new bacterial species isolated from human skin. *New Microbes and New Infections*. 22:17-18.
- Belkacemi S, Cassir N, Delerce J, Cadoret F, La Scola B. 2018b. "*Selenomonas massiliensis*," a new anaerobic bacterial species isolated from human oral microbiota. *New Microbes and New Infections*. 24:1-3.
- Berger P, Papazian L, Drancourt M, La Scola B, Auffray J, Raoult D. 2006. Ameba-associated microorganisms and diagnosis of nosocomial pneumonia. *Emerg Infect Dis* 12: 248–255.
- Beye M, Bakour S, Le Dault E, Rathored J, Michelle C, Cadoret F, Raoult D, Fournier PE. 2018. *Peptoniphilus lacydonensis* sp. nov., a new human-associated species isolated from a patient with chronic refractory sinusitis. *New Microbes and New Infections*. 23:61-69.
- Bilgin H, Sarmis A, Tigen E, Soyletir G, Mulazimoglu L. 2015. *Delftia acidovorans*: A rare pathogen in immunocompetent and immunocompromised patients. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 26(5):277-9.
- Boamah DK, Zhou G, Ensminger AW, O'Connor TJ. 2017. From Many Hosts, One Accidental Pathogen: The Diverse Protozoan Hosts of *Legionella*. *Front Cell Infect Microbiol*. 7: 477.
- Boon GC, Visvesvara GS, Byers TJ, Kelly DJ, Fuerst PA. 2005. Identification and Distribution of *Acanthamoeba* Species Genotypes Associated with nonkeratitis Infections. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, p. 1689-1693.
- Boyer M, Yutin N, Pagnier I, Barrassi L, Fournous G, Espinosa L, Robert C, Azza S, Sun S, Rossmann MG, Suzan-Monti M, La Scola B, Koonin EV, Raoult D. 2009. Giant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 21848–21853.
- Brahimi S, Cadoret F, Fournier P-E, Moal V, Raoult D. 2017. "*Lachnoclostridium urinimassiliense*" sp. nov. and "*Lachnoclostridium phocaeense*" sp. nov., two new bacterial species isolated from human urine after kidney transplantation. *New Microbes and New Infections*. 16:73-75.
- Bruker. 2018. MALDI Biotyper Systems. Disponível em: <<https://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/maldi-biotyper-systems.html>>. Acesso em 01 set. 2018.
- Cabello-Vílchez AM, Mena R, Zuñiga J, Cermeño P, Martín-Navarro CM, González AC, López-Arencibia A, Reyes-Batlle M, Piñero JE, Valladares B, Lorenzo-Morales J. 2014. Endosymbiotic *Mycobacterium chelonae* in a *Vermamoeba vermiformis* strain isolated from the nasal mucosa of an HIV patient in Lima, Peru. *Exp Parasitol*.145 Suppl:S127-30.
- Calvo L, Gregorio I, García A, Fernández MT, Goñi P, Clavel A, Peleato ML, Fillat MF. 2013. A new pentaplex-nested PCR to detect five pathogenic bacteria in free living amoebae. *Water Res*. 47(2):493-502.
- Carvalho FG, Moura H, Guimarães Neto FD, Salazar HC, Gonçalves AJ, Lomelino MR, Avila CM. 1983. Primary amoebic meningoencephalitis. A case report. *Rev. bras. neurol*;19(3):83-6.
- Cateau E, Delafont V, Hechard Y, Rodier MH. 2014b. Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections? *J Hosp Infect*. 2014 Jul;87(3):131-40.
- Cateau E, Imbert C, Rodier MH. 2008. *Hartmanella vermiformis* can be permissive for *Pseudomonas aeruginosa*. *Lett Appl Microbiol* 47:475–477.

- Cateau E, Maisonneuve E, Peguilhan S, Quellard N, Hechard Y, Rodier MH. 2014a. *Stenotrophomonas maltophilia* and *Vermamoeba vermiformis* relationships: bacterial multiplication and protection in amoebal-derived structures. *Res Microbiol* 165:847–851.
- Cateau E, Verdon J, Fernandez B, Hechard Y, Rodier MH. 2011. *Acanthamoeba* sp. promotes the survival and growth of *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett.* Jun;319(1):19-25.
- Chanzá M, Vidal S, Gimeno C. 2017. *Rhizobium radiobacter* in pulmonary abscess associated with postgripal necrotizing pneumonia. *Rev Esp Quimioter.* Feb;30(1):50-51.
- Choi SH, Cho MK, Ahn SC, et al. 2009. Endosymbionts of *Acanthamoeba* Isolated from Domestic Tap Water in Korea. *The Korean Journal of Parasitology.* 47(4):337-344.
- Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS, Bermudez LE. 1997. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infection and Immunity.* 65(9):3759-3767.
- Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS. 1994. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect Immun* 62: 3254–3261.
- Coenye T, Vancanneyt M, Falsen E, Swings J, Vandamme P. 2003. *Achromobacter insolitus* sp. nov. and *Achromobacter spanius* sp. nov., from human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53(Pt 6):1819-24.
- Corsaro D, Michel R, Walochnik J, Müller KD, Greub G. 2010. *Saccamoeba lacustris*, sp. nov. (Amoebozoa: Lobosea: Hartmannellidae), a new lobose amoeba, parasitized by the novel chlamydia '*Candidatus Metachlamydia lacustris*' (Chlamydiae: Parachlamydiaceae). *Eur J Protistol.*46(2):86-95.
- Corsaro D, Müller KD, Michel R. 2013. Molecular characterization and ultrastructure of a new amoeba endoparasite belonging to the *Stenotrophomonas maltophilia* complex. *Exp Parasitol.* Apr;133(4):383-90.
- Coşkun KA, Özçelik S, Tutar L, Elaldı N, Tutar Y. 2013. Isolation and identification of free-living amoebae from tap water in Sivas, Turkey. *Biomed Res Int.* 2013:675145.
- De Carli GA, MOURA, H. 2001. Amebas de Vida. In: De Carli GA (Ed). **Parasitologia clínica:** seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas. São Paulo: Editora Atheneu. cap. 21, p.417-427.
- Del Chierico F, Di Cave D, Accardi C, Santoro M, Masotti A, D'Alfonso R, Berrilli F, Urbani A, Putignani L. 2016. Identification and typing of free-living *Acanthamoeba* spp. by MALDI-TOF MS Biotyper. *Exp Parasitol.* Nov;170:82-89.
- Delafont V, Bouchon D, Héchard Y, Moulin L. 2016. Environmental factors shaping cultured free-living amoebae and their associated bacterial community within drinking water network. *Water Res.* 100:382-392.
- Delafont V, Brouke A, Bouchon D, Moulin L, Héchard Y. 2013 Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water. *Water Res.* 1;47(19):6958-65.
- Delafont V, Mougari F, Cambau E, Joyeux M, Bouchon D, Héchard Y, Moulin L. 2014. First evidence of amoebae mycobacteria association in drinking water network. *Environ Sci Technol* 48:11872–11882.
- Delafont V, Rodier MH, Maisonneuve E, Cateau E. 2018. *Vermamoeba vermiformis*: a Free-Living Amoeba of Interest. *Microb Ecol.* May 8.

- Diop A, Khelaifia S, Armstrong N, Labas N, Fournier PE, Raoult D, Million M. 2016. Microbial culturomics unravels the halophilic microbiota repertoire of table salt: description of *Gracilibacillus massiliensis* sp. nov. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 27:10.3402/mehd.v27.32049.
- Diop K, Diop A, Michelle C, Richez M, Rathored J, Bretelle F, Fournier PE, Fenollar F. 2018. Description of three new *Peptoniphilus* species cultured in the vaginal fluid of a woman diagnosed with bacterial vaginosis: *Peptoniphilus pacaensis* sp. nov., *Peptoniphilus raoultii* sp. nov., and *Peptoniphilus vaginalis* sp. nov. *Microbiologyopen*. Jun 21:e00661.
- Djaballah CE, Kitouni M, Raoult D, Khelaifia S. 2018. “*Streptomyces massialgeriensis*” sp. nov., a new bacterial species isolated from an extremely saline soil collected from the dry lake of Ank el Djamel in Algeria. *New Microbes and New Infections*. 21:18-19.
- Dubourg G, Baron S, Cadoret F, Couderc C, Fournier PE, Lagier JC, Raoult D. 2018. From Culturomics to Clinical Microbiology and Forward. *Emerging Infectious Diseases*. 24(9):1683-1690.
- Evstigneeva A, Raoult D, Karpachevskiy L, La Scola B. 2009. Amoeba co-culture of soil specimens recovered 33 different bacteria, including four new species and *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*. Feb;155(Pt 2):657-64.
- Fall NS, Raoult D, Sokhna C, Lagier JC. 2018. “*Helcococcus massiliensis*” sp. nov., a new bacterial species isolated from the vaginal sample of a woman with bacterial vaginosis living in Dielmo, Senegal. *New Microbes and New Infections*. 25:27-29.
- Filho ÉBC, Marson FAL, Levy CE. 2017. Challenges in the identification of *Chryseobacterium indologenes* and *Elizabethkingia meningoseptica* in cases of nosocomial infections and patients with cystic fibrosis. *New Microbes and New Infections*. 20:27-33.
- Fosse T, Peloux Y, Granthil C, Toga B, Bertrando J, Sethian M. 1985. Meningitis due to *Micrococcus luteus*. *Infection*. 13(6):280-1.
- Garcia A, Goñi P, Cieloszyk J, Fernandez MT, Calvo-Beguería L, Rubio E, Fillat MF, Peleato ML, Clavel A. 2013. Identification of free-living amoebae and amoeba-associated bacteria from reservoirs and water treatment plants by molecular techniques. *Environ Sci Technol*. 47(7):3132-40
- González-Castro A, Alsasua A, Peñasco Y, Rodríguez JC, Duerto J. 2017. Tracheo-bronchitis and pneumonia associated with mechanical ventilation by *Chryseobacterium indologenes*. *Rev Esp Anestesiología Reanimación* 64:294–298.
- González-Escobar JL, Grajales-Lagunes A, Smoliński A, Chagolla-López A, De León-Rodríguez A, Barba de la Rosa AP. 2018. Microbiota of edible *Liometopum apiculatum* ant larvae reveals potential functions related to their nutritional value. *Food Res Int*. 109:497-505.
- Greub G, La Scola B, Raoult D. 2003. *Parachlamydia acanthamoeba* is endosymbiotic or lytic for *Acanthamoeba polyphaga* depending on the incubation temperature. *Ann N Y Acad Sci*. 990: 628–634.
- Greub G, La Scola B, Raoult D. 2004. Amoebae-resisting bacteria isolated from human nasal swabs by amoebal coculture. *Emerg Infect Dis*. Mar;10(3):470-7.
- Greub G, Raoul, D. 2003. History of the ADP/ATPtranslocase-encoding gene, a parasitism gene transferred from a Chlamydiales ancestor to plants 1 billion years ago. *Appl Environ Microbiol*. 69: 5530–5535.

- Greub G, Raoult D. 2004. Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. Clin Microbiol Rev., v. 17(2), p. 413-433.
- Greub G. 2012. Culturomics: a new approach to study the human microbiome. Clin Microbiol Infect. Dec;18(12):1157-9.
- Guerra NC, Nobre A, Cravino J. 2013. Native mitral valve endocarditis due to *Rhizobium radiobacter* - first case report. Rev Port Cir Cardiorac Vasc. Oct-Dec;20(4):203-5.
- Hewett, MK. 2006. **Characterisation Of bacterial symbionts in amoebae.** Thesis (Doctor of Philosophy) – School of Pharmaceutical, Molecular and Biomedical Sciences University of South Australia and CRC for Water Quality and Treatment, University of South Australia, Adelaide.
- Hsueh PR, Teng LJ, Yang PC, Chen YC, Pan HJ, Ho SW, Luh KT. 1998. Nosocomial infections caused by *Sphingomonas paucimobilis*: clinical features and microbiological characteristics. Clin Infect Dis. 26(3):676-81.
- Inoue T, Asari S, Tahara K, Hayashi K, Kiritoshi A, Shimomura Y. 1998. *Acanthamoeba* keratitis with symbiosis of *Hartmannella* ameba. Am J Ophthalmol 125:721–723.
- Jacquier N, Aeby S, Lienard J, Greub G. 2013. Discovery of new intracellular pathogens by amoebal coculture and amoebal enrichment approaches. J Vis Exp. Oct 27;(80): e51055.
- Kalita M, Małek W. 2010. Genista tinctoria microsymbionts from Poland are new members of *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*. Syst Appl Microbiol. 33(5):252-9.
- Kawamura I, Yagi T, Hatakeyama K, Ohkura T, Ohkusu K, Takahashi Y, Kojima S, Hasegawa Y. 2011. Recurrent vascular catheter-related bacteremia caused by *Delftia acidovorans* with different antimicrobial susceptibility profiles. J Infect Chemother.17(1):111-3.
- Kebbi-Beghdadi C, Greub G. 2014. Importance of amoebae as a tool to isolate amoeba-resisting microorganisms and for their ecology and evolution: the Chlamydia paradigm. Environ Microbiol Rep.6(4):309-24.
- Khan S, Sistla S, Dhodapkar R, Parija SC. 2012. Fatal *Delftia acidovorans* infection in an immunocompetent patient with empyema. Asian Pac J Trop Biomed. 2(11):923-4. doi: 10.1016/S2221-1691(12)60254-8.
- Kim M-H, Rho M, Choi JP, Choi HI, Park HK, Song WJ, Min TK, Cho SH, Cho YJ, Kim YK, Yang S, Pyun BY. 2017. A Metagenomic Analysis Provides a Culture-Independent Pathogen Detection for Atopic Dermatitis. Allergy, Asthma & Immunology Research.
- Kuiper MW, Rinske MV, Wullings BA, Boonstra H, Smidt, H, Kooij, D. 2006. Quantitative detection of the free-living amoeba *Hartmannella vermiformis* in surface water by using real-time PCR. Appl Environ Microbiol 72:5750–575.
- La Scola B, Boyadjiev I, Greub G, Khamis A, Martin C, Raoult D. 2003a. Amoeba-resisting bacteria and ventilator-associated pneumonia. Emerg Infect Dis. 9(7):815-21.
- La Scola B, Mallet MN, Grimont PA, Raoult D. 2003b. *Bosea eneeae* sp. nov., *Bosea massiliensis* sp. nov. and *Bosea vestrisii* sp. nov., isolated from hospital water supplies, and emendation of the genus *Bosea* (Das et al. 1996). Int J Syst Evol Microbiol. Jan;53(Pt 1):15-20.
- La Scola B, Mezi L, Auffray JP, Berland Y, Raoult D. 2002. Patients in the intensive care unit are exposed to amoeba-associated pathogens. Infect Control Hosp Epidemiol. 23(8):462-5.

- La Scola B, Mezi L, Weiller PJ, Raoult D. 2001. Isolation of *Legionella anisa* Using an Amoebic Coculture Procedure. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(1):365-366.
- La Scola B, Audic S, Robert C, Jungang L, de Lamballerie X, Drancourt M, Birtles R, Claverie JM, Raoult D. 2003c. A giant virus in amoebae. *Science*, 299, p 2033.
- La Scola B. 2014. Looking at protists as a source of pathogenic viruses. *Microb Pathog*. 77:131-5.
- Lagier JC, Armougom F, Million M, Hugon P, Pagnier I, Robert C, Bittar F, Fournous G, Gimenez G, Maraninchi M, Trape JF, Koonin EV, La Scola B, Raoult D. 2012. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin Microbiol Infect*. Dec;18(12):1185-93.
- Lagier JC, Dubourg G, Million M, Cadoret F, Bilen M, Fenollar F, Levasseur A, Rolain JM, Fournier PE, Raoult D. 2018. Culturing the human microbiota and culturomics. *Nat Rev Microbiol*. May 1:540-550.
- Lienard J, Croxatto A, Gervaix A, Lévi Y, Loret JF, Posfay-Barbe KM, Greub G. 2017. Prevalence and diversity of Chlamydiales and other amoeba-resisting bacteria in domestic drinking water systems. *New Microbes and New Infections*. 15:107-116.
- Lienard J, Greub G. 2011. Discovering new pathogens: Amoebae as tools to isolate amoeba-resisting microorganisms from environmental samples. In: Ashbolt N, Sen K. (eds). **Environmental Microbiology: Current Technology and Water Applications**. Norfolk, UK: Caister Academic Press, p. 143–162.
- Lin YT, Jeng YY, Lin ML, Yu KW, Wang FD, Liu CY. 2010. Clinical and microbiological characteristics of *Chryseobacterium indologenes* bacteremia. *J Microbiol Immunol Infect*. 43:498-505
- Lorenzo-Morales J, Martínez-Carretero E, Batista N, Álvarez-Marín J, Bahaya Y, Walochnik J, Valladares B. 2007. Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Parasitol Res* 102:167–169.
- Maisonneuve E, Cateau E, Delouche M, Quellard N, Rodier MH. 2017. An observational study of phagocytes and *Klebsiella pneumoniae* relationships: different behaviors. *Microbes Infect*. Apr-May;19(4-5):259-266.
- Marciano-Cabral F, Jamerson M, Kaneshiro ES. 2010. Free-living amoebae, *Legionella* and *Mycobacterium* in tap water supplied by a municipal drinking water utility in the USA. *J Water Health*. 8(1):71-82.
- Martina PF, Martínez M, Frada G, et al. 2017. First time identification of *Pandoraea sputorum* from a patient with cystic fibrosis in Argentina: a case report. *BMC Pulmonary Medicine*. 2017; 17:33.
- Maschio VJ, Corção G, Rott MB. 2015. Identification of *Pseudomonas* spp. as amoeba-resistant microorganisms in isolates of *Acanthamoeba*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 57(1):81-3
- Medie FM, Salah IB, Henrissat B, Raoult D, Drancourt M. 2011. *Mycobacterium tuberculosis* complex mycobacteria as amoeba-resistant organisms. *PLoS One* 6, e20499.
- Megha K, Sharma M, Gupta A, Sehgal R, Khurana S. 2018. Protein profiling of *Acanthamoeba* species using MALDI-TOF MS for specific identification of *Acanthamoeba* genotype. *Parasitology Research*, 117(3), 729–736.
- Mehmood H, Khan N, Ullah S, Ullah A, Marwat A. 2018. A Rare Case of *Sphingomonas paucimobilis* Meningitis in the Absence of Cerebrospinal Fluid

- Pleocytosis. *Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports*. 6:2324709618756424.
- Miltiados G, Elisaf M. 2011. Native valve endocarditis due to *Micrococcus luteus*: a case report and review of the literature. *Journal of Medical Case Reports*, 5, 251.
- Miltner EC, Bermudez LE. 2000. *Mycobacterium avium* grown in *Acanthamoeba castellanii* is protected from the effects of antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother*. 44(7):1990-4.
- Misra R, Prasad KN, Singh K, Bhaduria D, Sharma RK. 2014. *Rhizobium radiobacter* peritonitis: the first case report from India and review. *JMM Case Reports*. 1(4):e004051.
- Miyamoto H, Yamamoto H, Arima K, Fujii J, Maruta K, Izu K, Shiomori T, Yoshida S. 1997. Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of Legionellae in hospital cooling tower water. *Appl Environ Microbiol* 63:2489–2494.
- Moore LSP, Owens DS, Jepson A, Turton JF, Ashworth S, Donaldson H, Holmes AH. 2016. Waterborne *Elizabethkingia meningoseptica* in Adult Critical Care. *Emerging Infectious Diseases*. 22(1):9-17.
- Moraes J, Alfieri SC. 2008. Growth, encystment and survival of *Acanthamoeba castellanii* grazing on different bacteria. *FEMS Microbiol Ecol*. 66(2):221-9.
- Morand A, Cornu F, Tsimaratos M, Cadoret F, Lagier JC, Fournier PE, Raoult D. 2016. “*Urinacoccus massiliensis*” gen. nov. sp. nov., identified in urine sample of a 7-year-old boy hospitalized for dental care under general anaesthesia. *New Microbes and New Infections*. 14:36-37.
- Moura H, Izquierdo F, Woolfitt AR, Wagner G, Pinto T, del Aguila C, Barr JR. 2015. Detection of Biomarkers of Pathogenic *Naegleria fowleri* Through Mass Spectrometry and Proteomics. *The Journal of eukaryotic microbiology*.62(1):12-20.
- Muchesa P, Leifels M, Jurzik L, Hoorzook KB, Barnard TG, Bartie C. 2017. Coexistence of free-living amoebae and bacteria in selected South African hospital water distribution systems. *Parasitol Res*.116(1):155-165.
- Mukerji R, Kakarala R, Smith SJ, Kusz HG. 2016. *Chryseobacterium indologenes*: an emerging infection in the USA. *BMJ Case Rep*. Apr 6;2016.
- Ndiaye C, Bassène H, Cadoret F, Raoult D, Lagier JC, Sokhna C. 2018. “*Citricoccus massiliensis*” sp. nov., a new bacterial species isolated from human skin by culturomics. *New Microbes and New Infections*. 23:83-85.
- Neves D. 2005. Amebas de Vida Livre. In: Neves DP, Melo AL, Linardi, PM. **Parasitologia Humana**. 11° ed. São Paulo: Ed. Atheneu.
- Nunes TE, Brazil NT, Fuentefria AM, Rott MB. 2016. *Acanthamoeba* and *Fusarium* interactions: A possible problem in keratitis. *Acta Trop*. 157:102-7.
- Ogata H, La Scola B, Audic S, Renesto P, Blanc G, Robert C, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D. 2006. Genome sequence of *Rickettsia bellii* illuminates the role of amoebae in gene exchanges between intracellular pathogens. *PLoS Genet* 2: e76.
- Otto M. 2009. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Nature reviews Microbiology*.7(8):555-567.
- Ovrutsky AR, Chan ED, Kartalija M, Bai X, Jackson M, Gibbs S, Falkinham JO 3rd, Iseman MD, Reynolds PR, McDonnell G, Thomas V. 2013. Cooccurrence of free-living amoebae and nontuberculous Mycobacteria in hospital water

- networks, and preferential growth of *Mycobacterium avium* in *Acanthamoeba lenticulata*. *Appl Environ Microbiol.* 79(10):3185-92.
- Pagnier I, Raoult D, La Scola B. 2008. Isolation and identification of amoeba-resisting bacteria from water in human environment by using an *Acanthamoeba polyphaga* co-culture procedure. *Environ Microbiol.* May;10(5):1135-44.
- Pagnier I, Valles C, Raoult D, La Scola B. 2015. Isolation of *Vermamoeba vermiformis* and associated bacteria in hospital water. *Microb Pathog.* Mar;80:14-20.
- Papadioti A, Azhar EI, Bibi F, Jiman-Fatani A, Aboushoushah SM, Yasir M, Raoult D, Angelakis E. 2017a. "*Arthrobacter saudimassiliensis*" sp. nov. a new bacterial species isolated from air samples in the urban environment of Makkah, Saudi Arabia. *New Microbes and New Infections.* 16:41-42.
- Papadioti A, Azhar EI, Bibi F, Jiman-Fatani A, Aboushoushah SM, Yasir M, Raoult D, Angelakis E. 2017b. "*Jeotgalicoccus saudimassiliensis*" sp. nov., a new bacterial species isolated from air samples in the urban environment of Makkah, Saudi Arabia. *New Microbes and New Infections.* 15:128-130.
- Papadioti A, Azhar EI, Bibi F, Jiman-Fatani A, Aboushoushah SM, Yasir M, Raoult D, Angelakis E. 2017c. "*Lysinibacillus saudimassiliensis*" sp. nov., a new bacterial species isolated from air samples in the urban environment of Makkah, Saudi Arabia. *New Microbes and New Infections.* 16:25-27.
- Pelandakis M, Serre S, Pernin P. 2000. Analysis of the 5.8S Rrna gene and the internal transcribed spacers in *Naegleria* spp. and in *N. fowleri*. *J Eukaryot Microbiol* 47:116–121.
- Perola O, Nousiainen T, Suomalainen S, Aukee S, Karkkainen U, Kauppinen J, Ojanen T, Katila M. 2002. Recurrent *Sphingomonas paucimobilis*-bacteremia associated with a multi-bacterial water-borne epidemic among neutropenic patients. *J. Hosp. Infect.* 50, 196 – 201.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Mendez M, Kibbler C, Erzsebet P, Chang SC, Gibbs DL, Newell VA. 2006. *Candida guilliermondii*, an Opportunistic Fungal Pathogen with Decreased Susceptibility to Fluconazole: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program. *Journal of Clinical Microbiology.* 44(10):3551-3556.
- Philippe N, Legendre M, Doutre G, Couté Y, Poirot O, Lescot M, Arslan D, Seltzer V, Bertaux L, Bruley C, Garin J, Claverie JM, Abergel C. 2013. Pandoraviruses: amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes. *Science* 341: 281–286.
- Pimentel JD, MacLeod C. 2008. Misidentification of *Pandora* species Isolated from Sputum of a Patient with Cystic Fibrosis and Review of *Pandora* Species Infections in Transplant Patients. *Journal of Clinical Microbiology.* 46(9):3165-3168.
- Pinheiro L, Ivo Brito C, de Oliveira A, Yoshida Faccioli Martins P, Cataneli Pereira V, Ribeiro de Souza da Cunha M de L. 2015. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: Molecular Detection of Cytotoxin and Enterotoxin Genes. Fujinaga Y, ed. *Toxins.* 7(9):3688-3699.
- Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO. 2004. Health Impacts of Environmental Mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 98–106.
- Qu JH, Yuan HL. 2008. *Sediminibacterium salmoneum* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum Bacteroidetes isolated from sediment of a eutrophic reservoir. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58(Pt 9):2191-4.

- Rahi P, Prakash O, Shouche YS. 2016. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Microbial Identifications: Challenges and Scopes for Microbial Ecologists. *Frontiers in Microbiology*. 7:1359.
- Reyna-Fabián ME, Zermeño V, Ximénez C, et al. 2016. Analysis of the Bacterial Diversity in Liver Abscess: Differences between Pyogenic and Amebic Abscesses. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 94(1):147-155.
- Rodriguez-Zaragoza S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Crit. Rev. Microbiol.*v.20, p. 225-241.
- Rowbotham TJ. 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *Journal of Clinical Pathology*, 33, 1179-1183.
- Saisongkroh W, Robert C, La Scola B, Raoult D, Rolain J-M. 2010. Evidence of Transfer by Conjugation of Type IV Secretion System Genes between *Bartonella* Species and *Rhizobium radiobacter* in Amoeba. Hansen IA, ed. *PLoS ONE*. 5(9):e12666.
- Salah IB, Ghigo E, Drancourt M. 2009. Free-living amoebae, a training field for macrophage resistance of mycobacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 894–905.
- Salles-Gomes Jr. CE, Barbosa ER, Nobrega JPS, Scaff M, Spina-França A. 1978. Meningoencefalomielite amebiana primaria: registro de caso. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 36(2), 139-142.
- Samba-Louaka A, Robino E, Cochard T, Branger M, Delafont V, Aucher W, Wambeke W, Bannantine JP, Biet F, Héchard Y. 2018. Environmental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Hosted by Free-Living Amoebae. *Front Cell Infect Microbiol.* 8:28.
- Satola B, Wübbeler JH, Steinbüchel A. 2013. Metabolic characteristics of the species *Variovorax paradoxus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97(2):541-60.
- Scheid P. 2014. Relevance of free-living amoebae as hosts for phylogenetically diverse microorganisms. *Parasitol. Res.* 113, 2407–2414.
- Schmitz-Esser S, Toenshoff ER, Haider S, Heinz E, Hoenninger VM, Wagner M, Horn M. 2008. Diversity of Bacterial Endosymbionts of Environmental *Acanthamoeba* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*.74(18):5822-5831.
- Slimani M, Pagnier I, Raoult D, La Scola B. 2013. Amoebae as battlefields for bacteria, giant viruses, and virophages. *J Virol. Apr*;87(8):4783-5.
- Smith KJ, Neafie R, Yeager J, Skelton HG. 1999. *Micrococcus folliculitis* in HIV-1 disease. *Br J Dermatol.*141(3):558-61.
- Snelling WJ, McKenna JP, Lecky DM, Dooley JSG. 2005. Survival of *Campylobacter jejuni* in Waterborne Protozoa. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(9):5560-5571.
- Soares SS, Souza TK, Berté FK, Cantarelli VV, Rott MB. 2017. Occurrence of Infected Free-Living Amoebae in Cooling Towers of Southern Brazil. *Curr Microbiol. Dec*;74(12):1461-1468.
- Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. 2004. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 42(5):2074-9.
- Staggemeier R, Arantes T, Caumo KS, Rott MB, Spilki FR. 2016. Detection and quantification of human adenovirus genomes in *Acanthamoeba* isolated from

- swimming pools. An. Acad. Bras. Ciênc., Rio de Janeiro , v. 88, supl. 1, p. 635-641.
- Sudharani V, Asiya, Saxena NK. 2011. *Chryseobacterium indologenes* bacteraemia in a preterm baby. Indian J Med Microbiol. 29:196-8
- Szymańska J. 2007. Bacterial contamination of water in dental unit reservoirs. Ann Agric Environ Med. 14(1):137-40.
- Tandina F, Almeras L, Koné AK, Doumbo OK, Raoult D, Parola P. 2016. Use of MALDI-TOF MS and culturomics to identify mosquitoes and their midgut microbiota. Parasites & Vectors. 9(1):495.
- Taş T, Küçükbayrak A, Koçoğlu E, Özsoy S, Bucak O, Tekelioğlu ÜY, Hakyemez İN. 2012. Nosocomial pneumonia and bacteremia caused by *Delftia acidovorans* related to arterial catheter. Dicle Med J. 39:452-4.
- Thom S, Warhurst D, Drasar BS. 1992. Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. J Med Microbiol. May;36(5):303–306.
- Thomas BS, Okamoto K, Bankowski MJ, Seto TB. 2013. A lethal case of *Pseudomonas putida* bacteremia due to soft tissue infection. Infectious diseases in clinical practice (Baltimore, Md).21(3):147-213.
- Thomas JM, Ashbolt NJ. 2011. Do free-living amoebae in treated drinking water systems present an emerging health risk. Environ Sci Technol. Feb 1;45(3):860-9.
- Thomas V, Bertelli C, Collyn F, Casson N, Telenti A, Goesmann A, Croxatto A, Greub G. 2011. Lausannevirus, a giant amoebal virus encoding histone doublets. Environ Microbiol 13: 1454–1466.
- Thomas V, Greub G. 2010. Amoeba/amoebal symbiont genetic transfers: lessons from giant virus neighbours. Intervirology 53: 254–267.
- Thomas V, Herrera-Rimann K, Blanc DS, Greub G. 2006. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. Appl Environ Microbiol. Apr;72(4):2428-38.
- Thomas V, Loret JF, Jousset M, Greub G. 2008. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. Environ Microbiol. Oct;10(10):2728-45.
- Thomas V, McDonnell G, Denyer SP, Maillard JY. 2010. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. FEMS Microbiol Rev. May;34(3):231-59.
- Tiwari S, Beriha SS. 2015. Primary Bacteremia Caused by *Rhizobium radiobacter* in Neonate: A Rare Case Report. Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR. 9(10):DD01-DD02.
- Togo AH, Camara A, Konaté S, Doumbo OK, Raoult D, Million M. 2018. "*Lactomassilus timonensis*", a new anaerobic bacterial species isolated from the milk of a healthy African mother. New Microbes and New Infections. 21:122-124.
- Török JK, Polla'k B, Hee'ger Z, Csiko's G, Ma'rialigeti K. 2008. First evidence of bacterial endocytobionts in the lobose testate amoeba *Arcella* (Amoebozoa, Arcellinida). Protistology 5,303–312.
- Trnková K, Kotrbancová M, Špaleková M, Fulová M, Boledovičová J, Vesteg M. 2018. MALDI-TOF MS analysis as a useful tool for an identification of *Legionella pneumophila*, a facultatively pathogenic bacterium interacting with free-living amoebae: A case study from water supply system of hospitals in Bratislava (Slovakia). Exp Parasitol. Jan;184:97-102.

- Vanessa B, Virginie M, Nathalie Q, Marie-Hélène R, Christine I. 2012. *Hartmannella vermiformis* can promote proliferation of *Candida* spp. in tap-water. *Water Res.* 46(17):5707-5714.
- Villanueva MP, Medina G, Fernández H. *Arcobacter butzleri* survives within trophozoite of *Acanthamoeba castellanii*. *Rev Argent Microbiol.* Apr-Jun;48(2):105-9.
- Visvesvara GS. 2010. Amebic meningoencephalitis and keratitis: challenges in diagnosis and treatment. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 23(6), 590–594.
- Von Eiff C, Kuhn N, Herrmann M, Weber S, Peters G. 1996. *Micrococcus luteus* as a cause of recurrent bacteremia. *Pediatr Infect Dis J.*15(8):711-3.
- Wang H, Edwards M, Falkinham JO, Pruden A. 2012. Molecular survey of the occurrence of *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and amoeba hosts in two chloraminated drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 78:6285–6294.
- Wang X, Hu Z, Fan Y, Wang H. 2014. *Chryseobacterium indologenes* catheter-related meningitis in an elderly patient after intracranial aneurysm clipping surgery. *Neurol Sci.*35(1):113-5.
- Weekers PH, Bodelier PL, Wijen JP, Vogels GD. 1993. Effects of Grazing by the Free-Living Soil Amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on Various Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 59(7):2317-9.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.*173 (2):697-703.
- Wheat WH, Casali AL, Thomas V, Spencer JS, Lahiri R, Williams DL, McDonnell GE, Gonzalez-Juarrero M, Brennan PJ, Jackson M. 2014. Long-term survival and virulence of *Mycobacterium leprae* in amoebal cysts. *PLoS Negl Trop Dis* 8:3405.
- Wu HT, Mi ZL, Zhang JX, Chen C, Xie SG. 2014. Bacterial communities associated with an occurrence of colored water in an urban drinking water distribution system. *Biomed Environ Sci.* 27(8):646-50.
- Yousuf FA, Siddiqui R, Khan NA. 2017. Presence of rotavirus and free-living amoebae in the water supplies of Karachi, Pakistan. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 59:e32.
- Yu HS, Jeong HJ, Hong YC, Seol SY, Chung DI, Kong HH. 2007. Natural occurrence of *Mycobacterium* as an endosymbiont of *Acanthamoeba* isolated from a contact lens storage case. *Korean J Parasitol.* Mar;45(1):11-8.

10. ANEXO

ANEXO I - Protocolo de extração para identificação via MALDI-TOF MS (Biotyper - Biotyper Bruker Daltonics)

- 1) Em um eppendorf, adicionar 300 µl de água milli-Q;
- 2) Transferir uma colônia bem carregada ao eppendorf com o auxílio de uma ponteira de 200 µl.
- 3) Homogeneizar a amostra com leve batidas no eppendorf. A água contida no eppendorf deverá ficar turva;
- 4) Adicionar ao eppendorf 900 µl de etanol absoluto. A amostra poderá ser armazenada nestas condições para leitura posterior por até uma semana;
- 5) Centrifugar a amostra por 2 minutos na velocidade máxima de 13.000 a 15.000 rpm;
- 6) Retirar o sobrenadante e remover o excesso de líquido batendo levemente o eppendorf sobre um papel toalha;
- 7) Para a remoção do líquido restante, acionar o spin da centrífuga;
- 8) Retirar o líquido restante com o auxílio da pipeta de 200 µl;
- 9) Adicionar 50 µl de ácido fórmico 70%;
- 10) Ressuspender o material com o auxílio da pipeta;
- 11) Homogeneizar a amostra no vórtex e aguardar o ácido agir de 20 a 30 minutos;
- 12) Adicionar 50 µl de acetonitrila;
- 13) Homogeneizar a amostra no vórtex;
- 14) Centrifugar por 2 minutos na velocidade máxima de 13.000 a 15.000 rpm;
- 15) Adicionar 1 µl do sobrenadante no spot da placa de aço inoxidável;
- 16) Esperar secar;
- 17) Adicionar 1 µl de matriz no spot sobre a amostra. A matriz poderá ser aplicada em até 30 minutos após a aplicação da amostra;
- 18) Esperar secar até ficar com uma cor opaca amarela e realizar a leitura no equipamento.