



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 AMEBAS DE VIDA LIVRE E ENDOSSIMBIONTES EM
POEIRA DE AR CONDICIONADO DE UM HOSPITAL ESCOLA DO INTERIOR DO
RS.**

DANIELLY JOANI BULLÉ

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Marilise Brittes Rott

Co-orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Lisianne Brittes Benitez

Porto Alegre

03/2019

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

DANIELLY JOANI BULLÉ

**IDENTIFICAÇÃO DE AMEBAS DE VIDA LIVRE E ENDOSSIMBIONTES EM
POEIRA DE AR CONDICIONADO DE UM HOSPITAL ESCOLA DO INTERIOR DO
RS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Marilise Brittes Rott

Co-orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Lisianne Brittes Benitez

Porto Alegre

03/2019

iii

FICHA CATALOGRÁFICA

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota”

(Theodore Roosevelt)

Dedico este trabalho à minha filha Manuela, a razão de todo ou meu esforço.

AGRADECIMENTOS

Sempre ouvi dizer que os grandes mestres se constroem em meio às dificuldades; esses 4 anos de pesquisa foram árduos e desafiadores, uma jornada de construção e amadurecimento.

Um vencedor, não necessariamente acerta constantemente! O verdadeiro vencedor tem a plena convicção de que enfrentar e vencer as dificuldades são primariamente importantes, do que desistir de tudo. Na vida de todos nós surgirão situações inesperadas, que fugirão do nosso controle e são nesses momentos que manifestamos o que carregamos no nosso coração!

Nesse período aprendi que o nosso trabalho é uma extensão de nós mesmos, então para que algo de valor seja produzido, temos que criar valor a nós mesmos.

Sendo assim, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Agradeço a Ele também por manter o meu marido ao meu lado, com a saúde que ela está hoje.

Agradeço aos meus pais, que sempre me motivaram, me mostraram o quanto era importante estudar, mesmo não tendo eles a mesma oportunidade no passado.

Agradeço ao meu marido Gustavo e a minha filha Manuela que entenderam as minhas faltas e os momentos de afastamento e reclusão, sempre acreditando que tudo iria dar certo.

Agradeço muito à Professora Marilise pela disposição em me orientar; e agradeço imensamente pela paciência e a confiança nesses anos e estudo.

Agradeço aos demais colegas do Grupo de Pesquisa em Amebas de Vida Livre e a parceria de todos nesse doutorado, que ainda renderá muitos frutos.

Agradeço a todos os colegas de doutorado, que vivenciaram momentos de estudo, de escrita de artigo e de tensão. Em especial a Laura, minha colega e companheira de trabalho.

Também preciso falar dos meus colegas de trabalho, professores da UNISC, os quais agradeço por toda a força, empenho e amor que dedicaram e dedicam a mim.

Agradeço à minha co-orientadora Lisianne, obrigada pela força, dedicação e conselhos.

Agradeço aos membros da banca que aceitaram participar dessa fase

importante da minha vida, pois vocês foram escolhidos porque com certeza têm muito a acrescentar na minha formação.

Agradeço à UFRGS, ao Programa e Pós-Graduação e à UNISC que me propiciaram desenvolver esse projeto.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que me apoiaram e me ajudaram para que mais essa etapa fosse vencida.

IDENTIFICAÇÃO DE AMEBAS DE VIDA LIVRE E ENDOSSIMBIONTES EM POEIRA DE AR CONDICIONADO DE UM HOSPITAL ESCOLA DO INTERIOR DO RS¹.

Autor: Danielly Joani Bullé

Orientador (a): Prof^(a). Dr^(a). Marilise Brittes Rott

Co-orientador (a): Prof^(a). Dr^(a). Lisianne Brittes Benitez

RESUMO

As Amebas de vida livre (AVL) são protozoários unicelulares, distribuídos em diferentes habitats e capazes de sobreviver em condições extremas de temperatura e pH. Os principais gêneros considerados potencialmente patogênicos (PP) são *Acanthamoeba*, *Naegleria* e *Balamuthia*. A nutrição das AVL dá-se por fagocitose, principalmente de bactérias, que podem se replicar dentro destes micro-organismos tornando-se resistentes às amebas. O objetivo do estudo foi determinar a presença de AVL/PP e sua relação com endossimbiontes na poeira de ar condicionado do Hospital Santa Cruz do Sul (HSC), RS. Foram realizadas culturas monoxênicas, identificação morfológica (critérios de Page, 1988), avaliação da patogenicidade (testes de termo e osmotolerância) e identificação molecular (PCR e FISH). Das 234 amostras, 170 (72,6%) apresentaram crescimento amebiano, sendo identificadas como *Acanthamoeba* spp. Destas, 122 (71,8%) foram caracterizadas como PP. Em 40 (23,5%) destas foi identificado o gênero *Pseudomonas* como endossimbionte e através de FISH, 26 amostras foram confirmadas como *P. aeruginosa*. Dos 40 isolados de amebas com *Pseudomonas*, 31 (77,5%) foram consideradas PP e 19 (61,2%) foram isoladas nas UTI. Na análise sequencial 73% das AVL são *Acanthamoeba castellanii*, sendo 96,8% destas pertencentes ao genótipo T4 e 25,8% estão infectadas com *Pseudomonas aeruginosa*. A maioria dos isolados foram identificados como pertencentes ao genótipo T4. Portanto, o presente estudo identificou a presença de AVL potencialmente patogênicas que transportam bactérias no sistema de ar condicionado do HSC alertando para a o risco de infecções nosocômiais por estes micro-organismos.

¹ Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Porto Alegre, Março, 2018.

IDENTIFICATION OF FREE LIVING AMOEBAS AND ENDOSYMBIONTES IN AIR CONDITIONER DUST IN A HOSPITAL SCHOOL FROM RS¹.

Author: Danielly Joani Bullé

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

Co-Advisor: Prof^(a). Dr^(a). Lisianne Brittes Benitez

ABSTRACT

Free-living amoebae (FLA) are unicellular protozoa, distributed in different habitats and able to survive in extreme conditions of temperature and pH. *Acanthamoeba*, *Naegleria* and *Balamuthia* are the main genera considered potentially pathogenic (PP). FLA nutrition occurs through phagocytosis, mainly of bacteria, that can replicate within these microorganisms and become resistant to amoebae. The objective of the present study was to determine the presence of FLA, their pathogenic potential and relationship with endosymbionts in the air conditioner dust from Hospital de Santa Cruz do Sul (HSC), RS. Monoxenic cultures, morphological identification (Page, 1988), pathogenic potential (*thermo- and osmo-tolerance* tests) and molecular identification (PCR, FISH) were performed. Of the 234 samples, 170 (72.6%) presented amoebic growth, being identified as *Acanthamoeba* spp. Of these, 122 (71.8%) were characterized as PP. In 40 (23.5%) of these the endosymbiont *Pseudomonas* was identified, and 26 were confirmed as *P. aeruginosa* by FISH. From the 40 amoebae with *Pseudomonas* spp., 31 (77.5%) were considered PP and 19 (61.2%) were isolated in the ICU. Therefore, the present study identified the presence of PP FLA transporting bacteria in the air conditioner system from HSC serving as an alert to the possibility of nosocomial infections by these microorganisms.

¹ Doctoral Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Porto Alegre, Março, 2018.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	16
2.OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3.REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 Amebas de Vida Livre	19
3.2 Morfologia e Taxonomia	22
3.3 Principais gêneros de AVL	25
3.3.2 Gênero <i>Naegleria</i>	26
3.3.3 Gênero <i>Balamuthia</i>	27
3.3.4 Gênero <i>Vermamoeba</i>	27
3.4 Doenças causadas por Amebas de Vida Livre	28
3.4.1 Ceratite Amebiana (CA)	28
3.4.2 Meningoencefalite amebiana primária (MAP).....	31
3.5 Identificação de AVL	32
3.6 Bactérias resistentes a Amebas de Vida Livre	34
3.7 Interação entre ameba de vida livre e micro-organismos	35
3.8 Dispersão de AVL em ambiente hospitalar	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. Local do Estudo e amostragem.....	39
4.2. Cultura Monoxênica para Isolamento de AVL	40
4.3 Teste de Exflagelação	40
4.4 Identificação do potencial patogênico das AVL através dos testes de termotolerância e osmotolerância	40
4.4.1. Teste de Termotolerância.....	41
4.5 Teste de Osmotolerância	41
4.6 Características Morfológicas das Amebas de Vida Livre	41
4.7. Identificação Molecular dos gêneros de AVL	41

4.7.1. Extração de DNA.....	42
4.7.2. Quantificação do DNA.....	42
4.7.3. Reação em Cadeia da Polimerase.....	42
4.7.4. <i>Fluorescence in situ Hybridization</i> (FISH)	45
4.8. Análise Estatística	48
4.9. Considerações Éticas.....	48
5. ARTIGO 1.....	49
6. ARTIGO 2.....	96
7. DISCUSSÃO GERAL	124
8. CONCLUSÃO.....	126
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
10. ANEXOS	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos locais da coleta no HSC.	40
Tabela 2. Descrição detalhada dos Oligonucleotídeos gênero-específico e condições de amplificação das PCRs.	44
Tabela 3. Características das sondas marcadas com Cy3 utilizada para a identificação de micro-organismos.	45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – A.** Trofozoíto de *Acanthamoeba* spp. em contraste de fase observado por microscopia óptica (1000X); **B.** Trofozoíto de *Acanthamoeba* spp. em placa de cultivo monoxênico observado por microscopia óptica (100X). (Fonte: Laboratório de Parasitologia UFRGS – Grupo de Pesquisa Amebas de Vida Livre, 2015).23
- Figura 2 – A.** Cisto de *Acanthamoeba* spp. em imersão observado através de microscopia de contraste de fase. **B.** Cisto de *Acanthamoeba* spp. em cultura monoxênica observado com microscópio óptico (aumento 100X). (Fonte: Laboratório de Parasitologia UFRGS – Grupo de *Pesquisa Amebas de Vida Livre*, 2015).24
- Figura 3 –** Classificação taxonômica das amebas proposta pela Sociedade Internacional de Protistologistas (Fonte: Adaptado de (KHAN, 2006).....25
- Figura 4 – (A)** Cisto de *Acanthamoeba* pertencente ao grupo morfológico I; **(B)** Cisto de *Acanthamoeba* pertencente ao grupo morfológico II; **(C)** Cisto de *Acanthamoeba* pertencente ao grupo morfológico III (Fonte: (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	ambulatório
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AVL	amebas de vida livre
BLC	bloco cirúrgico
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
COZ	cozinha
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	deoxinucleotídeos trifosfato
EAG	Encefalite Amebiana Granulomatosa
FISH	<i>Fluorescence in situ Hybridization</i>
HSC	Hospital Santa Cruz
MAP	Meningoencefalite Amebiana Primária
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PP	Potencialmente patogênico
RNA	ácido ribonucleico
RPM	rotações por minuto
TE	Tris-EDTA
TECNOUNISC	Parque Científico e Tecnológico Regional
TM	<i>Trade Mark</i>
TSA	ágar triptose de soja
UFC	Unidade formadora de colônia

1. INTRODUÇÃO

As Amebas de vida livre (AVL) são protozoários unicelulares que têm despertado interesse na comunidade científica por serem considerados agentes potencialmente patogênicos capazes de ocasionar infecções graves e fatais, como a ceratite e as encefalites. As AVL estão distribuídas nos mais variados habitats, como por exemplo, solo, água, poeira, piscinas e ambientes hospitalares, podendo sobreviver a condições extremas de temperatura e pH (TRABELSI et al., 2016). Este grupo de organismos pode, portanto, apresentar caráter anfitrião (MAJID et al., 2017).

Os gêneros *Acanthamoeba*, *Naegleria* e *Balamuthia* têm sido mais frequentemente isolados, sendo o gênero *Acanthamoeba* o mais prevalente. A nutrição das AVL ocorre pela fagocitose de diversos micro-organismos, mas principalmente pela ingestão de bactérias. Quando as bactérias ingeridas resistem ao processo de fagocitose, podem multiplicar-se no interior das amebas e assim serem transmitidas aos seres humanos e aos animais (OVRUTSKY et al., 2013).

Diversas espécies bacterianas têm sido encontradas em associação com estes protozoários, por exemplo, *Mycobacterium avium*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, entre outras. A associação destas bactérias com as amebas as torna resistente à maioria dos processos de desinfecção em ambiente hospitalar e aos diversos tratamentos de água, representando um grave problema de saúde pública (DELAFONT et al., 2016).

A contaminação do ambiente hospitalar por AVL propicia a exposição dos indivíduos a estes protozoários e aos seus endossimbiontes, significando real possibilidade de disseminação de infecções, especialmente entre os indivíduos imunocomprometidos (LASJERDI et al., 2011). Além disso, a presença destas amebas neste meio indica que as medidas de desinfecção utilizadas são insuficientes para removê-las, sendo necessário alertar os profissionais de saúde para que haja mais atenção aos processos de limpeza e desinfecção utilizados nos hospitais (TRABELSI et al., 2016).

São necessários profissionais qualificados para realização do diagnóstico correto e precoce de infecções ocasionadas por AVL e dos micro-organismos por elas veiculados, bem como a instituição de medidas adequadas para sua prevenção e controle.

Uma ameba pode se tornar o hospedeiro de bactérias, fazendo com que estas sobrevivam aos tratamentos de desinfecção da água facilitando a sua propagação e contaminação, principalmente no ambiente hospitalar, entre os indivíduos imunocomprometidos, alvos fáceis de qualquer infecção (DELAFONT et al., 2016; MUCHESA; BARNARD; BARTIE, 2015).

Portanto, baseando-se no fato de que estas amebas estão presentes nos mais variados habitats, incluindo ambientes hospitalares, onde causam graves infecções em indivíduos imunocomprometidos e de acordo com o exposto acima em relação à veiculação de micro-organismos, o presente estudo teve por objetivo isolar e identificar AVL e seus endossimbiontes na poeira do ar condicionado hospitalar. Este estudo será fundamental na conscientização sobre as possibilidades de infecções, prevenção e controle das AVL no meio hospitalar, disponibilizando assim mais informações sobre estes protozoários, além de esclarecer e auxiliar no diagnóstico e direcionar o tratamento das infecções relacionadas a elas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Determinar a frequência de AVL e identificar nelas a presença de endossimbiontes em amostras de poeira de ar condicionado em um hospital escola no interior do RS.

2.2. Objetivos Específicos

- Isolar as AVL em amostras de poeira de ar condicionado do ambiente hospitalar;
- Identificar morfológicamente as AVL através de critérios estabelecidos por Page, 1988;
- Identificar o potencial patogênico das AVL isoladas, através dos testes de termotolerância e osmotolerância;
- Identificar os gêneros de AVL através da análise do 18S rDNA;
- Identificar a presença de endossimbiontes bacterianos pela análise do gene 16S rDNA;
- Verificar a presença de endossimbiontes pela técnica de FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*) e através da amplificação dos genes específicos para identificação dessas bactérias;
- Determinar a frequência de *Pseudomonas* spp. *Legionella* spp., e *Mycobacterium* spp. através da PCR;
- Realizar a genotipagem dos isolados de *Acanthamoeba* através do sequenciamento de regiões específicas;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Amebas de Vida Livre

As Amebas de Vida Livre (AVL) constituem um grupo de protozoários unicelulares, que afetam tanto seres humanos quanto animais e estão amplamente distribuídos nos mais variados habitats, como por exemplo, em água doce, água salgada, piscinas, água mineral engarrafada, esgoto, solo, ar atmosférico, poeira, biofilmes, alimentos, aparelhos de ar condicionado, instrumental cirúrgico, unidades de diálise, soluções de lentes de contato e até mesmo entre os indivíduos saudáveis (KHAN, 2006; TEIXEIRA et al., 2009; VISVESVARA, 2013).

Estes micro-organismos já foram isolados em todos os continentes, nas mais diversas altitudes, sendo considerados fagócitos onipresentes muito resistentes a condições extremas de temperatura, pH, cloro e outros desinfetantes, bem como a todas as fases do saneamento de água e processos de ozonização e cloração. A nutrição das AVL é baseada em fungos, algas ou bactérias por fagocitose; entretanto, algumas bactérias podem ser resistentes à fagocitose, podendo multiplicar-se no interior da ameba, representando assim um importante risco para a saúde pública (CURSON; BROWN; KEYS, 1980; OVRUTSKY et al., 2013).

Há vários gêneros de AVL presentes na natureza, porém nem todos são considerados patogênicos para o homem. Algumas espécies como *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* e a *Acanthamoeba* spp. destacam-se pela associação com infecções tanto em humanos quanto em animais. Sabe-se atualmente que estes micro-organismos podem ocasionar meningoencefalite, encefalite granulomatosa, ceratite (úlceras da córnea), além de infecções nasofaríngeas e cutâneas, demonstrando a real importância do maior conhecimento sobre estes parasitas, bem como sua patogenia e epidemiologia (MAGNET et al., 2013; VISVESVARA, 2013).

As amebas pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*, família Acanthamoebidae, são anfizoicas, oportunistas/patogênicas e estão entre os protozoários mais abundantes encontrados nos mais variados habitats, como no solo, poeira, ar condicionado, lentes de contato, fontes de água, entre outros (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

Por ser considerado um gênero heterogêneo onde apenas certos subgrupos são considerados patogênicos, é difícil atribuir um papel específico a *Acanthamoeba* spp. nas infecções humanas. Estudos recentes referentes à

classificação do subgênero e da taxonomia de *Acanthamoeba* identificaram os subgrupos patogênicos, além de 20 genótipos diferentes (T1-T21) com base no sequenciamento do gene 18s do rRNA. Outros estudos demonstraram que isolados pertencentes aos genótipos T2, T3, T4, T5, T6, T11 e T15 podem estar associados à ceratite amebiana, sendo que a maioria das cepas que causam ceratite e encefalite amebiana granulomatosa pertencem ao genótipo T4 (CORSARO; VENDITTI, 2018; KAO et al., 2014; MAGHSOOD, 2005; MASCHIO; CORÇÃO; ROTT, 2015).

Apesar de ser amplamente encontrada nos mais diversos habitats, não há alta incidência de doenças ocasionadas por este gênero de AVL. Os indivíduos suscetíveis às infecções por *Acanthamoeba* spp. são os usuários de lentes de contato e imunocomprometidos, como por exemplo HIV positivos. A maioria dos casos de doença por estas amebas são a ceratite amebiana que acomete indivíduos saudáveis que utilizam lentes de contato ou sofreram algum trauma no globo ocular, e casos de infecções no cérebro, como a encefalite amebiana granulomatosa (EAG) (DA SILVA; DA ROSA, 2003b; NIYYATI; REZAEIAN, 2015; QVARNSTROM et al., 2006).

Acanthamoeba spp. pode servir de abrigo para muitas bactérias, protegendo estes micro-organismos de condições ambientais adversas, facilitando assim a transmissão e aumentando a virulência dos mesmos. Desta forma há certa facilitação da replicação celular e da sobrevivência de patógenos no organismo humano, como por exemplo, as espécies dos gêneros *Mycobacterium* e *Legionella* (EDDYANI et al., 2008).

Estudos relatam que a patogênese deste gênero está relacionada tanto a fatores extrínsecos quanto intrínsecos e afirmam que a ligação de *Acanthamoeba* spp. à célula hospedeira é mediada por proteínas de ligação à manose que levam a efeitos secundários, como fagocitose, apoptose e a secreção de proteases extracelulares, resultando em dano celular e tecidual do hospedeiro. As proteases extracelulares, principalmente serina e cisteína, são importantes na patogênese das infecções desempenhando a função de degradação dos tecidos do hospedeiro (LORENZO-MORALES et al., 2005; VISVESVARA et al., 2009).

O gênero *Naegleria*, pertencente à família Vahlkampfiidae, é o único gênero de AVL que apresenta uma espécie (*N. fowleri*) que possui um estágio flagelado, facilitando a sua mobilidade na água, além de apresentar-se sob a forma de cisto e trofozoíto. *N. fowleri* foi descrita como a única espécie deste gênero potencialmente patogênica ao homem, sendo capaz de levar um indivíduo saudável a óbito. É um

micro-organismo termofílico, tolerando temperaturas de até 45°C, fazendo com que a sua proliferação aumente nos meses mais quentes do ano, atingindo crianças e jovens adultos saudáveis que realizam atividades aquáticas como mergulho e natação no período de calor. Portanto, são isoladas principalmente em ambientes aquáticos, como rios, piscinas, lagos, fontes termais e água de torneira (PANDA et al., 2015). Estas amebas podem atingir o sistema nervoso central (SNC), por disseminação vascular e causar a meningoencefalite amebiana primária (MAP), doença aguda, fulminante, necrotizante e hemorrágica levando crianças e jovens adultos saudáveis ao óbito quando infectados (GARCIA et al., 2013; QVARNSTROM et al., 2006).

A patogenicidade *N. fowleri* depende da liberação de moléculas citolíticas que desempenham um papel importante na destruição das células hospedeiras e do SNC. A combinação da patogenicidade com a resposta imune gerada resulta em danos significativos, com necrose extensiva dos tecidos do SNC. O mecanismo de ação de *N. fowleri* é pouco conhecido, mas acredita-se que este micro-organismo realize uma interação com esteróides e fosfolipídios na membrana celular do hospedeiro através da ação inibitória contra a proteína quinase B (GRACE; ASBILL; VIRGA, 2015).

O gênero *Balamuthia*, destacando a espécie *Balamuthia mandrillaris* (única do gênero), pertencente à família Acanthamoebidae. Isolada principalmente do solo e, possivelmente, de fontes de água, *Balamuthia mandrillaris* pode causar EAG (principalmente em indivíduos imunocomprometidos como HIV positivos, usuários de drogas intravenosas e alcoólatras) (VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007a).

Balamuthia mandrillaris é capaz de infectar o hospedeiro via neuroepitélio olfatório (via respiratória), ou ainda por alguma ruptura da pele, através da poeira ou do solo, podendo atingir o SNC por disseminação hematogênica; contudo, os mecanismos utilizados por esta ameba para migrar para a barreira hematoencefálica ainda não estão totalmente elucidados (NIYYATI et al., 2018).

Os sintomas mais comuns da EAG são semelhantes a MAP, sendo eles: dores de cabeça, pescoço rígido, febre e fotofobia. À medida que a doença avança, outros sintomas ficam mais evidentes, como as náuseas, os vômitos, a mudança de personalidade, a afasia, a confusão aguda, as convulsões e a letargia, sendo estes relacionados com o aumento da pressão intracraniana (CABELLO-VÍLCHEZ et al., 2014).

Para causar doença em humanos, *B. mandrillaris* deve sobreviver fora do

hospedeiro em condições ambientais adversas como a alta osmolaridade, temperaturas variáveis, privação de nutrientes e resistência aos quimioterápicos. Assim como nos demais gêneros, o diagnóstico é complicado devido à semelhança da morfologia com as demais espécies, necessitando de técnicas específicas para a identificação, como a imunofluorescência. As taxas de mortalidade por este gênero são de 98% e ainda não foi relatado nenhum tratamento totalmente bem-sucedido para EAG (KHAN; SIDDIQUI, 2015).

O gênero *Vermamoeba*, anteriormente denominado *Hartmannella*, pertence à família Hartmannellidae. Suas células são anucleadas, contendo um nucléolo vesicular. A *Vermamoeba vermiformis* pertencente a esta família é considerada termotolerante, isolada frequentemente de fontes de água, torres de resfriamento de ar condicionado, spas e estações de distribuição de água potável (WATSON; SORRELL; BROWN, 2014).

Há poucos estudos que relatam a patogenicidade de *Vermamoeba* spp., principalmente de *V. vermiformis*, porém há relatos que comprovam a relação deste micro-organismo como hospedeiro para bactérias potencialmente patogênicas, como a *Legionella pneumophila* que utiliza a ameba para sobreviver, multiplicar-se e adquirir fatores de alta virulência (FOUQUE et al., 2014).

O gênero *Sappinia*, pertencente à família Thecamoebidae, possui duas espécies de relevância: a *Sappinia pedata* e a *Sappinia diploidea*. Essas amebas possuem trofozoítos binucleados e cistos bicelulares podendo ser isoladas de cascas de árvores e material vegetal decomposto, musgos, lagoas de água doce e solos. Possuem ampla distribuição no meio ambiente e podem ser consideradas amebas patogênicas envolvidas em infecções como a encefalite amebiana granulomatosa (com apenas um caso relatado envolvendo a *S. pedata*) (CORSARO et al., 2016).

3.2 Morfologia e Taxonomia

As AVL estão isentas de paredes celulares, a sua nutrição se dá por fagocitose e se reproduzem de forma assexuada por fissão binária. Estes micro-organismos infectam seus hospedeiros através de transmissão direta: como a cavidade oral, o trato respiratório e pele; ou ainda através de transmissão indireta como: lentes de contato e instrumentos cirúrgicos, podendo assim causar doença. Quando o tecido do hospedeiro é invadido, estes micro-organismos apresentam-se sob a forma de trofozoítos e cistos, se multiplicam e causam danos, resultando assim

em alguma patologia (CARDAS; KHAN; ALSAM, 2012).

No estágio de trofozoíto as AVL são metabolicamente ativas, locomovem-se e multiplicam-se, além de serem sensíveis a diversos estímulos nocivos, nutrindo-se de bactérias, leveduras, algas e pequenas partículas orgânicas. Na sua superfície possuem estruturas denominadas acantopódios que se projetam para fora da célula ou podem apresentar-se de forma globular, dependendo do gênero, permitindo a adesão do parasito a superfícies e os movimentos celulares (**Figura 1**) (VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007a).

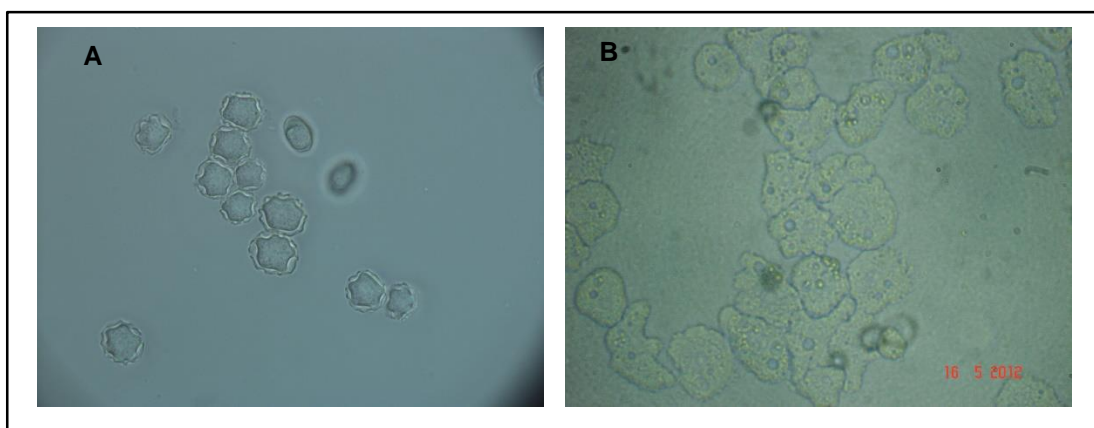


Figura 1 – **A.** Trofozoíto de *Acanthamoeba* spp. em contraste de fase observado por microscopia óptica (1000X); **B.** Trofozoíto de *Acanthamoeba* spp. em placa de cultivo monoxênico observado por microscopia óptica (100X). (Fonte: Laboratório de Parasitologia UFRGS – Grupo de Pesquisa Amebas de Vida Livre, 2015).

Em condições adversas, quando há falta de nutrientes, alta osmolaridade, temperatura elevada e pH alterado, o trofozoíto torna-se metabolicamente inativo, fazendo com que este se condense formando uma estrutura arredondada e resistente, o cisto, que possui parede dupla, sendo o endocisto a sua parede interna, composto principalmente por celulose, e o ectocisto a sua parede externa, composto por proteínas e polissacarídeos. Este processo de encistamento protege as AVL das mudanças ambientais e até mesmo de agentes químicos utilizados no tratamento da água. Quando há condições relativamente favoráveis para o seu crescimento, ocorre o processo de desencistamento, na qual o cisto retorna para a forma de trofozoíto (TRABELSI et al., 2012, 2016).

O cisto é uma forma resistente ou dormente, com tamanho variando de

13µm a 20µm dependendo da espécie de AVL, que pode sobreviver por até 20 anos, resistindo a condições extremas de temperatura, pH, falta de nutrientes e uma variedade de agentes químicos nocivos (**Figura 2**).

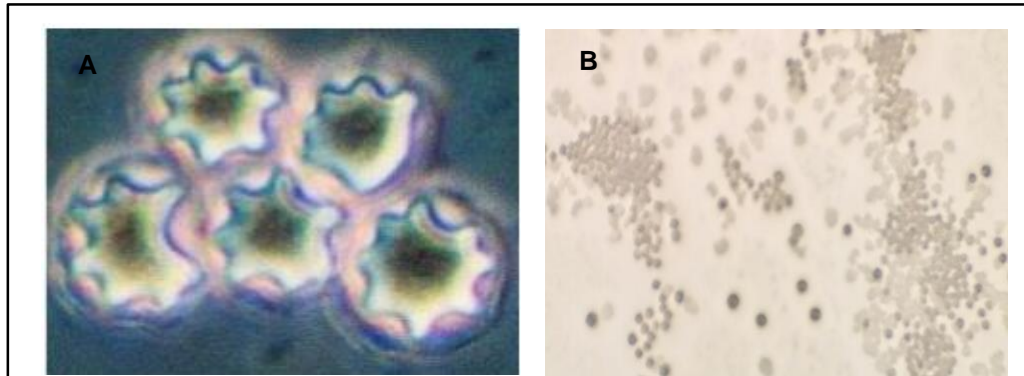


Figura 2 — **A.** Cisto de *Acanthamoeba* spp. em imersão observado através de microscopia de contraste de fase. **B.** Cisto de *Acanthamoeba* spp. em cultura monoxênica observado com microscópio óptico (aumento 100X). (Fonte: Laboratório de Parasitologia UFRGS – Grupo de *Pesquisa Amebas de Vida Livre*, 2015).

A classificação taxonômica de AVL está baseada na análise dos aspectos morfológicos, bioquímicos e moleculares (gene 5.8S e 18S rDNA) destes microorganismos. A nova classificação proposta pela Sociedade Internacional de Protistologistas está ilustrada na **Figura 3**.

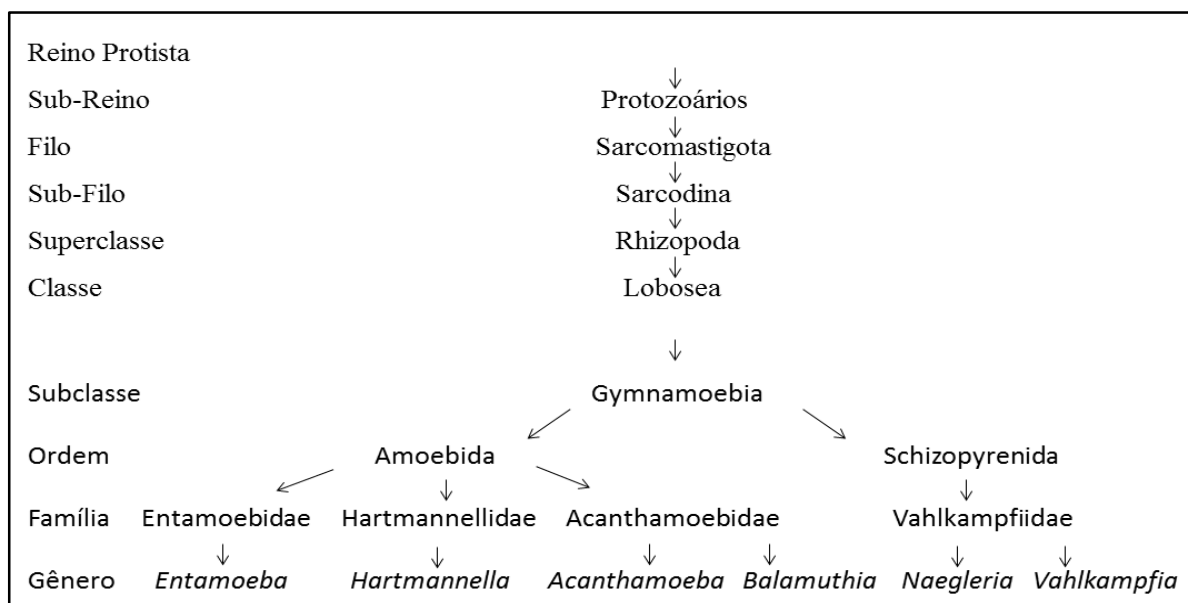


Figura 3 – Classificação taxonômica das amebas proposta pela Sociedade Internacional de Protistologistas (Fonte: Adaptado de (KHAN, 2006).

3.3 Principais gêneros de AVL

3.3.1 Gênero *Acanthamoeba*

Amebas do gênero *Acanthamoeba* apresentam uma fase trofozoítica, ativa e uma forma cística que se forma em condições desfavoráveis de sobrevivência, como a falta de nutrientes, alterações de pH ou de temperatura. O trofozoíto apresenta um tamanho variando entre 20µm e 40µm. Possui um núcleo com um grande cariossoma central, com halo claro. O citoplasma do trofozoíto é abundante e apresenta-se granuloso com movimentos e emissão de pseudópodos globosos e hialinos, de onde surgem numerosas projeções aciculiformes. Apresentam vacúolos pulsáteis que se contraem e ajudam na regulação osmótica (CROZETTA, 2007; ODDÓ B; CIANI A; VIAL C, 2009).

Em 1977, Pussard & Pons propuseram a divisão do gênero *Acanthamoeba* em três grupos morfológicos baseados no tamanho e na forma dos cistos (PUSSARD, R. PONS, 1977).

A classificação mais utilizada e aceita baseia-se em sequências do gene 18S rDNA, que permite a identificação de cerca de 20 genótipos (T1-T21), exibindo 5% ou mais de divergência entre si. O genótipo T4 está associado à maioria das infecções humanas ocasionadas por *Acanthamoeba*, é responsável por cerca de 90%

dos casos de ceratite amebiana por *Acanthamoeba*. Entre as infecções mais comuns, estão a ceratite amebiana, encefalite amebiana granulomatosa (EAG) e infecções cutâneas disseminadas. Os processos relacionados à patogenicidade de *Acanthamoeba* são complexos, pois envolvem uma gama de proteínas como adesinas, enzimas e glicoproteínas que trabalham em conjunto, desde a adesão até a instalação do processo infeccioso (CASTRILLÓN; OROZCO, 2013; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007a).

3.3.2 Gênero *Naegleria*

O gênero *Naegleria* é pertencente à família Vahlkampfiidae e é o único gênero de AVL capaz de possuir um estágio flagelado, facilitando a sua mobilidade na água, além de apresentar-se sob a forma de cisto e trofozoíto. Neste gênero destaca-se a espécie *N. fowleri*, descrita como a única espécie deste gênero potencialmente patogênica ao ser humano, capaz de levar um indivíduo saudável a óbito. A figura 5 ilustra os 3 estágios de *Naegleria* spp., o estágio flagelado, o trofozoíto e o cisto resistente (MAJID et al., 2017; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007a).

N. fowleri é um micro-organismo termofílico, ou seja, pode tolerar temperaturas de até 45°C, fazendo com que a sua proliferação aumente nos meses mais quentes do ano, atingindo crianças e jovens adultos saudáveis, pois, estes são mais ativos em atividades aquáticas como mergulho e natação. São isoladas em diversos habitats, mas principalmente de ambientes aquáticos, como rios, piscinas lagos, fontes termais e água de torneira (PANDA et al., 2015).

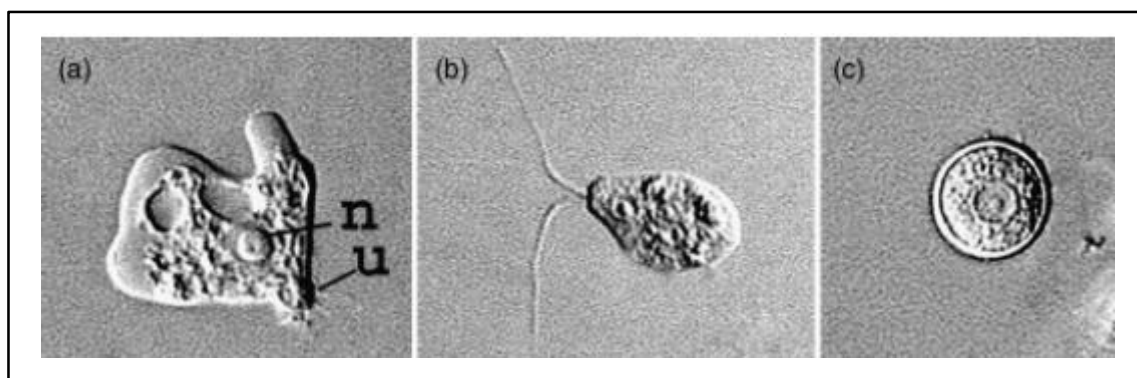


Figura 4 – (A) Trofozoíto de *Naegleria fowleri* – 1000x; **(B)** Estágio flagelado de *N. fowleri* – 1000x; **(C)** Cisto de *N. fowleri* – 1000x.

Estas amebas podem atingir o SNC, por disseminação vascular e causar lesões no cérebro resultando em meningoencefalite amebiana primária, uma doença aguda, fulminante, necrotizante e hemorrágica levando crianças e jovens adultos saudáveis a óbito quando infectados (GARCIA et al., 2013; QVARNSTROM et al., 2006).

A patogenicidade *N. fowleri* dependem da liberação de moléculas citolíticas que desempenham um papel importante na destruição das células hospedeiras e do nervo. A combinação da patogenicidade de *N. fowleri* e a resposta imune gerada resultam em danos significativos em dores e necrose extensiva nos tecidos do SNC. O mecanismo de ação de *N. fowleri* é incerto, mas acredita-se que interaja com esteróides e fosfolipídios na membrana celular, bem como através da ação inibitória contra a proteína quinase B (PANDA et al., 2015).

A identificação de *N. fowleri* não é um procedimento fácil, uma vez que vários gêneros de amebas encontrados nos mesmos habitats são morfologicamente semelhantes. O que difere *N. fowleri* das demais é a sua capacidade de emitir flagelos, o que é visível a microscópio óptico através do teste de exflagelação. Assim como para a identificação de *Acanthamoeba* spp., para a identificação de *N. fowleri* também pode-se utilizar a técnica de PCR (MARCIANO-CABRAL et al., 2003).

3.3.3 Gênero *Balamuthia*

Balamuthia spp. são morfologicamente semelhantes à *Acanthamoeba* spp. além de serem pertencentes a mesma família Acanthamoebidae. São isoladas principalmente do solo e possivelmente de fontes de água. É um gênero de AVL que não pode ser cultivada em placas de ágar revestidas com bactérias e sua fonte de alimentação ainda não é muito conhecida. A figura 6 ilustra os dois estágios de vida de *Balamuthia* spp., o trofozoíto e cisto (QVARNSTROM et al., 2006).

Balamuthia mandrillaris foi descrita pela primeira vez em 1986 a partir do cérebro de um babuíno que havia morrido de meningoencefalite. Já em humanos, o primeiro caso de *Balamuthia mandrillaris* ocasionou meningoencefalite em um paciente do sexo masculino tailandês após cair em um pântano (MAJID et al., 2017).

3.3.4 Gênero *Vermamoeba*

O gênero *Vermamoeba* anteriormente denominado de *Hartmannella* pertence à família Hartmannellidae e sua taxonomia não é bem conhecida, mas atualmente sabe-se que as suas células são não nucleadas e com um nucléolo vesicular. Amebas

como *Vermamoeba vermiformis* são pertencentes a esta família e são consideradas termotolerantes, isoladas frequentemente de fontes de água, torres de resfriamento de ar condicionado, spas e estações de distribuição de água potável (WATSON; SORRELL; BROWN, 2014).

Há poucos estudos que relatam a patogenicidade de *Vermamoeba* spp., principalmente de *V. vermiformis*, porém, há estudos que comprovam que *V. vermiformis* atua como hospedeiro para bactérias potencialmente patogênicas, como, *Legionella pneumophila* que utiliza a ameba para sobreviver, multiplicar-se e adquirir fatores de alta virulência (FOUQUE et al., 2014).

3.3.5 Gênero *Sappinia*

O gênero *Sappinia* é pertencente à família Thecamoebidae com duas espécies de relevância, *Sappinia pedata* e *Sappinia diploidea*. Essas amebas possuem trofozoítos binucleados e cistos bicelulares podendo ser isoladas de cascas de árvores e material vegetal morto, musgos, lagoas de água doce e solos. Possuem ampla distribuição no meio ambiente e podem ser consideradas amebas patogênicas envolvidas em infecções como a encefalite amebiana granulomatosa, porém, até hoje apenas um caso atribuído a *S. pedata* foi relatado (CORSARO et al., 2016; WALOCHNIK; WYLEZICH; MICHEL, 2010).

3.4 Doenças causadas por Amebas de Vida Livre

3.4.1 Ceratite Amebiana (CA)

A ceratite amebiana é uma infecção da córnea, ocasionada por amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* spp., onde os principais fatores de risco para a doença são o traumatismo da córnea, o uso de lentes de contato, o uso de solução salina contaminada por ameba e até mesmo a prática de nadar ou tomar banho enquanto estiver fazendo uso das lentes de contato (Figura 6). A ceratite não está relacionada diretamente com o uso de lentes de contato, mas sim a má higienização destas. É uma infecção que ocorre em indivíduos imunocompetentes, sendo considerada uma doença rara, com menos de um caso a cada 10.000 usuários de lentes de contato (DUARTE et al., 2013; KHAN, 2006).

Os principais e iniciais sintomas apresentados pelos pacientes infectados por ceratite amebiana são, lesões epiteliais, lesão subepitelial difusa ou focal, ptose

palpebral e hiperemia conjuntiva. Quando o edema atinge o estroma da córnea há a formação de um abscesso em forma de anel que é resultado da ação de macrófagos na área afetada. Após a formação deste abscesso, pode ocorrer sintomas como glaucoma, catarata, perfuração da córnea e infecções microbianas secundárias. Alguns sintomas como dor intensa, vermelhidão, visão embaçada e fotofobia podem ocorrer, mas não são específicos para ceratite amebiana, pois estes sintomas podem ser facilmente confundidos com ceratite viral, bacteriana ou fúngica (DART; SAW; KILVINGTON, 2009).

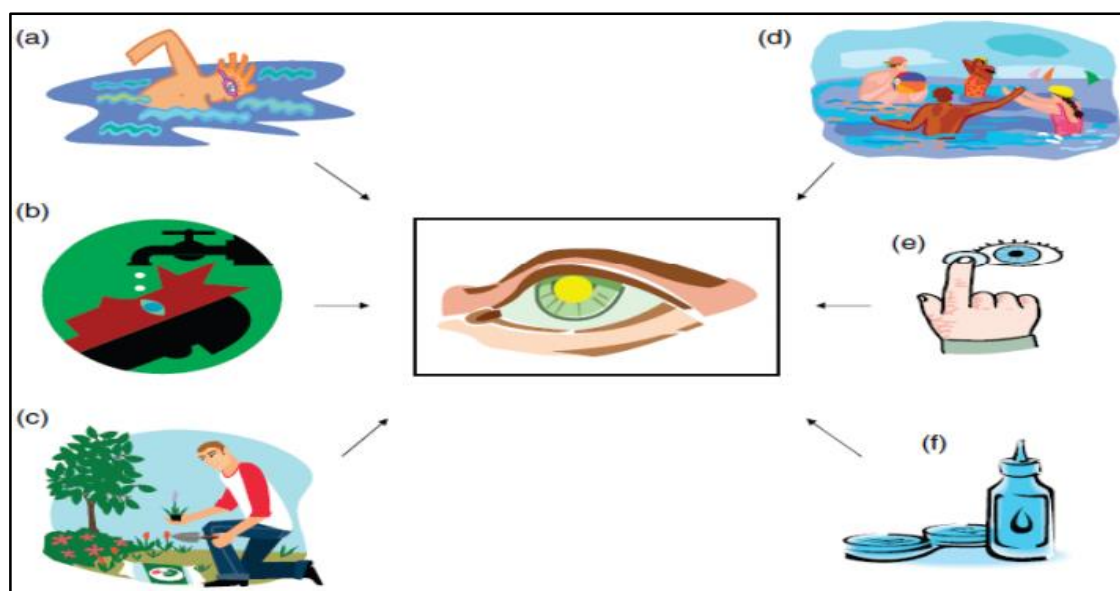


Figura 6 – Fatores de risco que contribuem para a ceratite ocasionada por *Acanthamoeba* spp. (Fonte: (KHAN, 2006).

Relativo à gravidade da infecção ocasionada por *Acanthamoeba* merece destaque o epitélio e estroma ulcerado exibindo a córnea de um paciente infectado com ceratite por *Acanthamoeba* spp., conforme ilustrado na figura 7 (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

O diagnóstico de ceratite amebiana pode ser realizado através de biópsias e o uso de microscopia de confocal, entretanto requer outros testes laboratoriais, como o cultivo de *Acanthamoeba* spp. a partir da amostra isolada da córnea (considerado o padrão ouro) ou da lente de contato, bem como técnicas de PCR ou de imunofluorescência (DART; SAW; KILVINGTON, 2009).

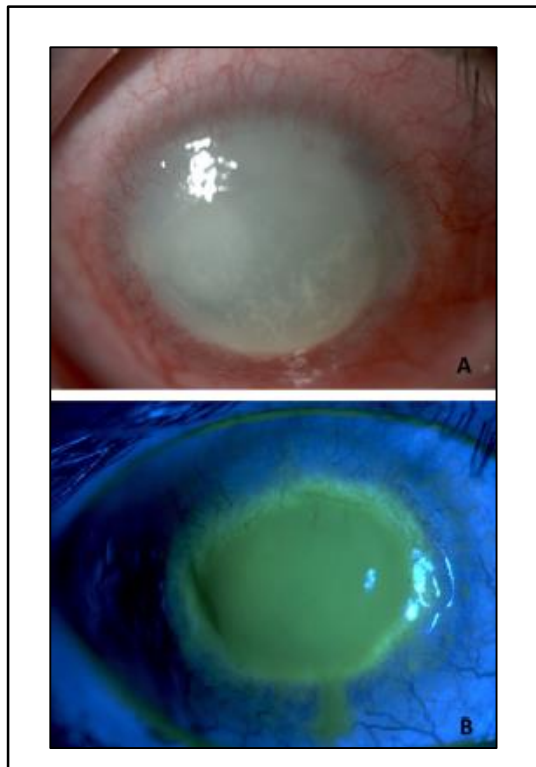


Figura 7 – (A) Fusão e Vascularização da córnea de um paciente com ceratite por *Acanthamoeba*; **(B)** Dano da córnea observado em paciente com ceratite amebiana ilustrado após a aplicação de furoseína (Fonte: (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

Atualmente, não há terapias eficientes e únicas para o tratamento de ceratite por *Acanthamoeba* spp., independente do isolado ou genótipo causador da doença. Isto é devido a sua ampla distribuição ambiental, bem como variável virulência das diferentes espécies do gênero. O que é utilizado nos poucos casos registrados no mundo, são medicamentos tópicos como biguanidas que é eficaz em concentrações baixas e infelizmente tóxico para as células da córnea e a clorexidina que é eficaz contra as duas formas amebianas e em concentrações mínimas não é considerada tóxica para as células da córnea. Alguns antifúngicos associados a estas classes de medicamentos citados já foram capazes de eliminar o progresso de ceratite ocasionada por *Acanthamoeba* spp. O uso de corticoides foi associado à infecção em casos de inflamação persistente (LIM et al., 2008; MARTÍN-NAVARRO et al., 2008).

Vários estudos realizados identificaram o genótipo T4 como o predominante causador de ceratite. O envolvimento deste genótipo com a infecção pode ser devido a sua maior abundância no ambiente, o que favorece o contato com os hospedeiros

(MAGHSOOD, 2005).

3.4.2 Meningoencefalite amebiana primária (MAP)

Meningoencefalite amebiana primária é uma doença infecciosa aguda causada por *Naegleria fowleri*. É uma doença caracterizada pelo seu mau prognóstico, devido à falta de informações e estudos sobre a mesma. O tempo entre o contato com a ameba e o início dos sintomas pode variar entre 2 e 15 dias, sendo os primeiros sintomas notáveis, dor torácica, dor de cabeça, letargia, e alteração do sentido do olfato. Quando a doença evolui o paciente ainda pode apresentar febre, vômitos, rigidez do pescoço, confusão mental e edema pulmonar evoluindo na maioria dos casos à morte, onde normalmente a causa é parada respiratória. Estudos de necropsia, relatam que há necrose intensa do tecido neural e hemorragia no bulbo olfativo e cérebro (BAIG, 2016; CERMENÑO et al., 2006).

A infecção ocorre quando a água contaminada por *N. fowleri* penetra na cavidade nasal de indivíduos que estão na água e as amebas se locomovem pelo nervo olfativo para atingir os bulbos olfativos do SNC. Ao atingir os bulbos olfativos, se espalham para as regiões mais posteriores do cérebro e há a ativação de uma resposta imune significativa através da ativação do sistema imune inato, incluindo macrófagos e neutrófilos. Após a infecção os indivíduos afetados podem apresentar inflamação grave do cérebro e das meninges, acompanhada de dor de cabeça forte, febre, vômitos, náuseas e anormalidades comportamentais (JAROLIM et al., 2000).

O diagnóstico laboratorial de MAP depende da demonstração de trofozoítos de *N. fowleri* no líquido cefalorraquidiano, exame microscópico, biópsias ou isolamento dos micro-organismos em cultura. No entanto, há muitas falhas no diagnóstico, uma vez que, nenhuma característica distinta diferencia a meningoencefalite amebiana primária de infecções bacterianas fulminantes, sendo frequentemente confundidas com tumores cerebrais, abscessos, toxoplasmose e até cisticercose, sendo então considerada uma infecção fulminante que pode levar muitos indivíduos à morte após 1 a 2 semanas do início dos sintomas (QVARNSTROM et al., 2006).

Estudos relatam que a falta de informações sobre a doença e o diagnóstico tardio é o que leva a maioria dos pacientes à óbito. Atualmente sabe-se que há a necessidade de profissionais bem qualificados, capazes de fazer o diagnóstico precoce da doença, que poderia resultar em sobrevivência do paciente. Assim como o diagnóstico é raro, o conhecimento sobre o tratamento também é raro. Mas atualmente quando diagnosticado emprega-se antifúngicos em associação com

antibióticos, sendo a anfotericina B a base do tratamento, podendo-se empregar outros fármacos, como por exemplo, rifampicina, fluconazol, azitromicina, entre outros (VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007b).

3.5 Identificação de AVL

A identificação dos gêneros, *Acanthamoeba*, *Naegleria* e *Balamuthia* pode ser realizada sem maiores dificuldades, uma vez que cada gênero possui suas características morfológicas específicas (KHAN, 2006).

Acanthamoeba spp., pode ser facilmente identificada pelos acantopódios (projeções espinhosas na sua superfície), que são fundamentais na patogênese deste micro-organismo, além dos demais critérios estabelecidos e relacionados por Page (1988) (PAGE, 1988). Atualmente há mais de 24 espécies de *Acanthamoeba* spp., com destaque para *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti* e *A. healy*, que foram relacionadas e identificadas em casos de infecções humanas. Estas espécies estão distribuídas em três grandes grupos tendo como base o aspecto morfológico e o tamanho dos cistos (PUSSARD, R. PONS, 1977).

As espécies do grupo I apresentam amebas grandes com cistos de 16 a 30 μm , e ectocisto com formato esférico, abrangendo algumas espécies como: *A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata* e *A. tubiashi*. A maioria das espécies presentes neste grupo não são consideradas patogênicas. No grupo II está concentrado o maior número de espécies, apresentando amebas com cistos de 18 μm ou menos, além de possuir um ectocisto enrugado, neste grupo encontram-se algumas espécies como: *A. mauritaniensis*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. divionensis*, *A. triangularis*, *A. lugdunensis*, *A. griffini*, *A. rhyodes*, *A. padivionensis* e *A. hatchetti*. Este grupo apresenta espécies potencialmente patogênicas, capazes de causar encefalite amebiana granulomatosa. Já o grupo III apresenta amebas com cistos de tamanho inferior a 18 μm que possuem um ectocisto fino e um endocisto redondo, destacando-se as espécies: *A. palestinensis*, *A. culbertsoni*, *A. royreba*, *A. lenticulata* e *A. pustulosa*. A **Figura 4** ilustra os cistos de *Acanthamoeba* spp. em cada grupo morfológico (VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007a).

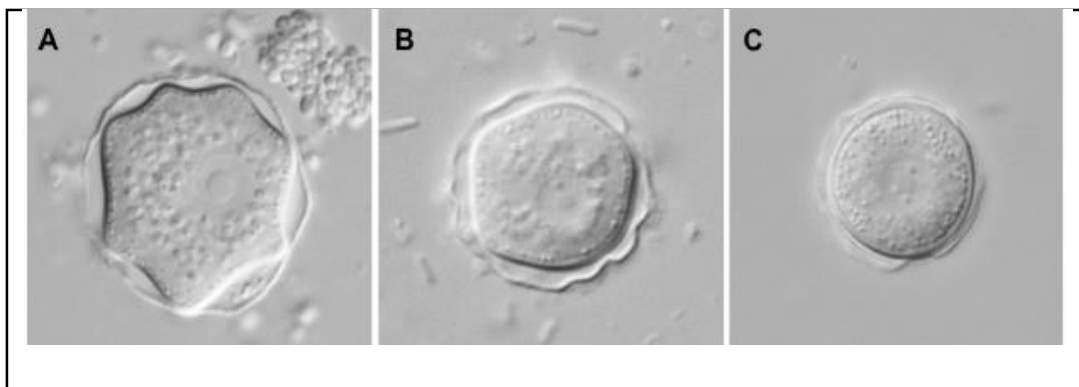


Figura 4 – (A) Cisto de *Acanthamoeba* pertencente ao grupo morfológico I; **(B)** Cisto de *Acanthamoeba* pertencente ao grupo morfológico II; **(C)** Cisto de *Acanthamoeba* pertencente ao grupo morfológico III (Fonte: (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

Para a análise do potencial patogênico de *Acanthamoeba* spp. são realizados testes fisiológicos de tolerância à temperatura e concentração molar, além de crescimento em meios com diferentes pH.

O gênero *Naegleria* spp. é composto por 47 espécies, sendo *N. fowleri* a única patogênica e sua identificação é realizada através do teste de exflagelação, onde se verifica a emissão dos flagelos do trofozoíto quando em contato com água (CARLESSO et al., 2007; NIYYATI; REZAEIAN, 2015).

O gênero *Balamuthia* spp., possui apenas a espécie *Balamuthia mandrillaris*, que é morfológicamente semelhante a *Acanthamoeba* spp. diferindo quanto ao tamanho que é geralmente maior (12 a 60 μm) e à forma do trofozoíto. A identificação de *Balamuthia mandrillaris* é realizada através da análise morfológica de cistos e trofozoítos e através de técnicas de biologia molecular para posterior confirmação. A imunofluorescência indireta também tem sido empregada para a identificação (NIYYATI et al., 2009; RETANA-MOREIRA et al., 2014; SIDDIQUI; JARROLL; KHAN, 2010).

A metodologia de hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH) é bastante utilizada para identificação, pois permite a visualização e discriminação dos micro-organismos *in situ*, sem a necessidade de cultivos celulares. É constituída basicamente pela fixação e permeabilização da amostra, hibridização, lavagem para remoção das sondas em excesso e observação em microscopia fluorescente (BOTTARI et al., 2006; MOTER; GÖBEL, 2000).

A identificação molecular baseada na amplificação de sequências

específicas do genoma através da PCR facilita a detecção de células que, muitas vezes não são identificadas pela cultura e pelo FISH, bem como permite a discriminação gênica, além de ser uma ferramenta de baixo custo quando comparada com sondas de fluorescência. O sequenciamento é outra técnica molecular que permite a identificação das espécies de AVL a partir da análise das sequências de nucleotídeos de um fragmento específico do genoma (RIVIÈRE et al., 2006).

3.6 Bactérias resistentes a Amebas de Vida Livre

As AVL servem como reservatórios e vetores ambientais de agentes patogênicos bacterianos. As bactérias que resistem à fusão lisossomal após terem sido fagocitadas pelas amebas podem se tornar resistentes incluindo patógenos como, por exemplo, *Chlamydia* spp., *Klebsiella* spp., *Legionella* spp., *Pseudomonas* spp., *Mycobacterium* spp. e *Streptococcus* spp., sendo resistentes também aos sistemas de tratamento de água e aos desinfetantes utilizados em hospitais e outros ambientes (DELAFONT et al., 2016; OVRUTSKY et al., 2013).

O termo “cavalo de Tróia” tem surgido para designar AVL que servem como reservatório para outros micro-organismos intracelulares se multiplicarem, servindo de veículos para disseminação de patógenos. A maioria dos isolados de AVL abrigam endossimbiontes que podem incluir vírus, fungos, protozoários e bactérias, podendo ser potencialmente patogênicos para seres humanos. Essas interações estão relacionadas à transmissão de endossimbiontes patogênicos para hospedeiros suscetíveis e/ou os endossimbiontes podem contribuir para a patogenicidade de certas AVL (COPE et al., 2018; SIDDIQUI; KHAN, 2012; VILLAJOS, J.R.O.; SIMÓ, 2008). Sabendo-se que AVL alimentam-se de bactérias, fungos e algas por fagocitose, e a digestão ocorre nos fagolissomos, alguns micro-organismos evoluíram para se tornarem resistentes, utilizando as AVL como hospedeiros, onde sobrevivem e reproduzem-se até serem liberados por meio da lise das amebas ou por liberação de vesículas cheias de micro-organismos inaláveis, são as chamadas bactérias resistentes a amebas (BRA). Entre as bactérias patogênicas que utilizam as AVL como reservatórios estão: *Bacillus cereus*, *Bartonella* spp., *Burkholderia* spp., *Campylobacter jejuni*, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila*, entre outras. Essas interações são muito complexas e dependem tanto da virulência da ameba, como da bactéria, além das condições

ambientais (SCHMITZ-ESSER et al., 2008; SIDDIQUI; KHAN, 2012).

Indivíduos hospitalizados e que fazem uso de aparelhos como tubos endotraqueais, sondas e cateteres são suscetíveis a infecções ocasionadas por AVL em concomitância com os endossimbiontes, uma vez que estas amebas podem aderir-se aos biofilmes promovendo a sua proliferação e lise. Atualmente essa associação entre os endossimbiontes e as AVL é pouco considerada pela comunidade científica, porém sabe-se que esta simbiose pode estar relacionada com infecções extremamente graves, como a pneumonia ou até mesmo a tuberculose (BRADBURY; FRENCH; BLIZZARD, 2014).

3.7 Interação entre ameba de vida livre e micro-organismos

Estudos mostram que algumas bactérias resistentes à fagocitose são capazes de alterar o ambiente fagossomal alguns minutos após a internalização, *Legionella pneumophila* e *Pseudomonas aeruginosa*, são exemplos de bactérias que modificam o tráfego do fagossomo evitando a entrada na via endocítica do hospedeiro, impedindo a imediata fusão fagossoma-lisossoma, através da construção de um nicho distinto que permite a replicação intracelular da bactéria (BRUGGEMANN et al., 2006; DENONCOURT; PAQUET; CHARETTE, 2014; KHAN; SIDDIQUI, 2015; MIYAKE; FUKUI; IMAI, 2006; SCHUNDER et al., 2010).

Depois de internalizadas as bactérias não patogênicas são mortas e usadas como alimento, enquanto as patogênicas modificam o mecanismo intracelular garantindo sua sobrevivência e multiplicando-se, liberadas através de vesículas, ou por lise celular. Algumas bactérias não se multiplicam dentro da ameba, ficam em estado vegetativo e após serem liberadas para o meio ambiente voltam ao seu estado normal (SIDDIQUI; DUDLEY; KHAN, 2012). Para evitar a digestão pelas amebas, bactérias podem expressar diferentes conjuntos de genes em resposta aos diferentes microambientes intracelulares para facilitar a sua sobrevivência e crescimento. As proteínas cuja expressão é regulada dentro dos compartimentos intracelulares podem constituir seu potencial fator de virulência (MIYAKE; FUKUI; IMAI, 2006). Os sistemas de secreção das bactérias desempenham um papel crucial no fornecimento dos fatores bacterianos envolvidos nestes processos para os seus sítios de ação. *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, produz várias enzimas e toxinas liberadas por diferentes sistemas de secreção (BEN HAJ KHALIFA et al., 2011; SIDDIQUI; KHAN, 2014). O estudo de simbioses e protozoários em AVL é relativamente recente.

Uma outra abordagem mostra que amebas de vida livre, podem ser utilizadas como ferramenta para descobrir novas bactérias intracelulares, investigar a patogenicidade, descobrir novos fatores de virulência, estudar as interações patógeno/hospedeiro, bem como os mecanismos de dispersão e manutenção de micro-organismos patogênicos no ambiente. O entendimento dessas interações deve ajudar na melhor compreensão de como alguns micro-organismos evoluíram tornando-se simbiotes enquanto outros evoluíram tornando-se patógenos (GREUB; RAOULT, 2004; KEBBI-BEGHDADI; GREUB, 2014).

3.8 Dispersão de AVL em ambiente hospitalar

A dispersão de AVL no ambiente hospitalar ocorre, principalmente, através dos sistemas condicionadores de ar, que podem alojar bactérias, fungos, vírus e protozoários, e a *Acanthamoeba* spp. (ETCHEBEHERE et al., 2005; OOI et al., 2016). Esses micro-organismos permanecem abrigados nesses sistemas por um período prolongado de tempo e se dispersam no ambiente interno hospitalar pelas correntes de ar (DA SILVA; DA ROSA, 2003b).

No Brasil existem normas reguladoras da qualidade do ar interno como a Resolução – RE nº 9, de 16 de janeiro de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estabelece padrões referenciais de qualidade do ar interior em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo. A periodicidade de limpeza e manutenção de equipamentos compostos por unidades filtrantes definidas pela ANVISA é mensal ou quando o filtro for descartável até sua obliteração (máximo 3 meses). Essa resolução lista as possíveis fontes de poluentes biológicos, inclusive protozoários e as principais medidas para controle destes no ambiente interno (BRASIL, 2003). A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) elaborou a norma NBR 7256, que aborda o tratamento de ar em estabelecimentos assistenciais de saúde, no que diz respeito aos requisitos para projeto e execução das instalações (NBR7256, 2005). Recentemente no Brasil, foi sancionada a Lei nº 13.589, de janeiro de 2018, que dispõe sobre a manutenção de instalações e equipamentos de sistemas de climatização de ambiente em todos os edifícios de uso público e coletivo que possuem ambientes climatizados artificialmente. Estas instituições devem possuir um plano de manutenção, operação e controle desses sistemas, visando à eliminação ou minimização de riscos potenciais à saúde dos ocupantes. Contudo, sabe-se que nem sempre as normas são observadas dificultando

a manutenção da qualidade do ar interno dos ambientes hospitalares (BRASIL, 2018).

A qualidade do ar em ambientes hospitalares está relacionada com a manutenção e limpeza dos sistemas de condicionamento de ar, pois estes acabam servindo de fontes de formação de biofilmes microbianos, como também desencadeadores do processo de disseminação de patógenos (LEUNG; CHAN, 2006). Neste contexto, devido ao seu papel oportunista o gênero *Acanthamoeba* spp. é conhecido pelo caráter carreador de patógenos, portanto o monitoramento deste protozoário em ambientes hospitalares é importante, podendo ser utilizado como um marcador da qualidade do ar em hospitais (CHAN et al., 2011; OOI et al., 2016).

Baseando-se no fato de que as bactérias carreadas por AVL são importantes causadoras de infecções hospitalares e também porque algumas espécies de AVL podem causar infecções fatais, é preocupante a presença destes micro-organismos nesses ambientes, já que muitos indivíduos internados podem apresentar-se imunocomprometidos. Em um estudo realizado em um hospital escola na Tunísia foram coletadas 84 amostras de água em diferentes locais do hospital. A presença de AVL foi detectada em 45 amostras, predominando o gênero *Acanthamoeba* spp. A PCR e o sequenciamento confirmaram a presença dos genótipos T4, T10 e T11 (TRABELSI et al., 2016).

Em outro estudo realizado por Lasjerdi e colaboradores (2011) foram coletadas 70 amostras de poeiras e biofilmes de diferentes ambientes de 5 hospitais em que haviam indivíduos imunodeprimidos (HIV positivos), com doenças malignas e outras condições imunossupressoras. Neste trabalho AVL foram identificadas em 22 das amostras de poeiras e 15 de biofilme (LASJERDI et al., 2011).

Para avaliar a ocorrência de AVL e micobactérias patogênicas em redes de água hospitalar, Ovrutsky e colaboradores no ano de 2013 coletaram 88 amostras de diferentes ambientes hospitalares, sendo 23 amostras de água e 65 de biofilme. Na maioria das amostras as AVL foram recuperadas e pertenciam ao gênero *Acanthamoeba* e ao genótipo T4. As micobactérias foram isoladas em 26 amostras, com maior número de isolados em amostras de biofilme e predominância da espécie *Mycobacterium gordonae* (OVRUTSKY et al., 2013).

No Brasil, Carlesso e colaboradores (2007) em um estudo para identificar AVL potencialmente patogênicas em amostras de ambientes de um hospital público de Porto Alegre (RS), coletaram 135 amostras de poeira e biofilmes em 15 ambientes diferentes do hospital. Destas, 47 (35%) foram positivas para AVL, sendo 16

classificadas como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* spp. (CARLESSO et al., 2007).

No hospital de ensino em Johannesburg na África do Sul foram coletadas 71 amostras, das quais 35 amostras eram de água de torneira, 30 amostras de *swab* seco e 6 amostras de água de chuveiro. Foi observada a presença de AVL em 63 amostras das 71 coletadas de água e biofilmes. Destas amostras positivas, 20 eram pertencentes ao gênero *Vermamoeba* (*Hartmanella*), 12 amostras à espécie *Balamuthia mandrillaris* e sete amostras ao gênero *Acanthamoeba* (MUCHESA; BARNARD; BARTIE, 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local do Estudo e amostragem

As amostras do estudo foram obtidas no Hospital Santa Cruz (HSC), uma entidade filantrópica, mantida pela Associação Pró-Ensino em Santa Cruz – APESC, com 109 anos de prestação de serviços na área hospitalar, oferecendo 232 leitos de internação com 23 mil metros quadrados (m²) de área construída (HSC, 2018 - <http://www.hospitalstacruz.com.br/sobre/numeros/> – acesso em 26/06/2018). Está situado na cidade de Santa Cruz do Sul – RS, na região conhecida como Vale do Rio Pardo contando com aproximadamente 120 mil habitantes (Brasil/IBGE, 2010).

As amostras utilizadas no estudo foram coletadas no período de março de 2015 a dezembro de 2016, e eram provenientes de poeira de ar condicionado do ambulatório (AMB), Bloco cirúrgico (BLC), Cozinha (COZ) UTI Adulto (UTIAD) e UTI Pediátrica (UTIPED) do HSC. O sistema de controle de qualidade do hospital prevê limpezas quinzenais por pessoal treinado de empresa de manutenção. As amostras foram coletadas, no mesmo dia em que foi realizada a limpeza de rotina nas diferentes áreas.

Estas amostras foram coletadas com o auxílio de um suabe estéril e seco, passados de forma aleatória sobre os filtros de cada ar condicionado do setor antes que fosse realizada a limpeza dos mesmos pela equipe de manutenção. As amostras foram processadas segundo Silva e Rosa (2003) (DA SILVA; DA ROSA, 2003b). Todos os critérios exigidos pelo hospital no momento da coleta das amostras foram respeitados com aprovação pelo CEP/UNISC, sob parecer de nº: 1.540.110/2016 e CAAE: 55494716.3.0000.5343.

Foram coletadas 234 amostras, aleatoriamente, a partir da poeira de ar condicionado conforme segue: 32 no AMB, 52 no BLC, 60 na COZ, 40 na UTIAD e 50 na UTIPED. Cada suabe foi colocado em tubo de ensaio identificado, contendo 2mL de água destilada esterilizada e posteriormente foram transportados para o Parque Científico e Tecnológico Regional (TECNOUNISC) na Universidade de Santa Cruz do Sul/RS.

As dimensões de cada uma das áreas, o tipo de ar condicionado, a média de circulação de pessoas em cada uma dessas unidades e o número de coletas estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Características dos locais da coleta no HSC.

Local	Dimensão da sala (m ²)	Tipo de ar	Média circulação pessoas (mês)	Nº coletas
AMB	112,5		16.000	32
BLC	92,6	Split pisso-teto	700	52
COZ	57		850	60
UTIAD	350,7		950	40
UTIPED	92,6		500	50

AMB: Ambulatório; BLC: Bloco Cirúrgico; COZ: Cozinha; UTIAD: UTI Adulta; UTIPED: UTI Pediátrica.

4.2. Cultura Monoxênica para Isolamento de AVL

Após a homogeneização em vortex e descarte dos suabes, as amostras foram centrifugadas e 100 µL do sedimento foram adicionados ao centro da placa contendo o meio ágar não nutritivo a 1,5% (Ágar Page) recoberto com suspensão bacteriana de *E. coli* (ATCC 11775) inativadas pelo calor, seladas com Parafilm® e incubadas a 30°C por 10 dias. Os procedimentos foram realizados em triplicata. Foram realizados repiques a fim de isolar as AVL e para impedir a contaminação por fungos. Observações em microscópio óptico (objetivas de 10x), em torno da área de semeadura, com placa invertida, foram realizadas em dias alternados.

4.3 Teste de Exflagelação

Para identificar a presença de *Naegleria fowleri* foi realizado o teste de exflagelação a partir de trofozoítos presentes nas culturas. Para isso, a superfície das placas de ágar Page foi coberta com 10mL de água destilada estéril e raspada delicadamente com o auxílio de uma alça de platina, para a obtenção de uma suspensão de AVL. Estas foram colocadas em garrafas estéreis de cultivo celular e incubadas a 37°C. Com um microscópio invertido as garrafas foram analisadas para verificar a emissão de flagelos a cada 30 minutos por um período de 4 horas. As amostras negativas foram observadas por até 24 horas e posteriormente descartadas (DA SILVA; DA ROSA, 2003b; DE CARLI, 2001).

4.4 Identificação do potencial patogênico das AVL através dos testes de

termotolerância e osmotolerância

4.4.1. Teste de Termotolerância

Para os testes de tolerância à temperatura, as placas de cultura monoxênica com crescimento amebiano, foram submetidas a diferentes temperaturas (30°C, 37°C e 42°C) por 10 dias, sendo a temperatura controle a de 30°C que é a temperatura ótima para o crescimento de AVL. A técnica foi realizada em triplicata para as temperaturas de 30°C, 37°C e 45°C, em placas contendo ágar não nutritivo 1,5% cobertas com uma suspensão de *Escherichia coli*, previamente incubadas a 56°C por 24 horas, mortas pelo calor para o crescimento de bactérias. O crescimento dos organismos foi representado por: (-) indicando a ausência de crescimento e (+, ++, +++) indicando o crescimento amebiano. Todas as placas foram analisadas diariamente até o décimo dia de inoculação (NEFF; NEFF, 1969).

4.5 Teste de Osmotolerância

Placas contendo ágar não-nutritivo que foi usado como controle e ágar não-nutritivo contendo manitol nas concentrações de 0,5 M, 1,0 M e 1,5 M foram previamente cobertas com *Escherichia coli* inativadas pelo calor. As placas foram incubadas a 30°C durante 120 horas. Em intervalos de 12 e 24 horas durante 120 horas foi medido o halo onde houve o crescimento das amebas e o consumo das bactérias. O diâmetro (em milímetros) do inóculo foi medido no momento da inoculação e o da zona clara onde houve crescimento das amebas e o consumo das bactérias na superfície do ágar foi medido em intervalos de 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h. A cepa padrão ATCC 30461 (*Acanthamoeba polyphaga*) foi utilizada como controle positivo. O teste foi realizado em triplicata.

4.6 Características Morfológicas das Amebas de Vida Livre

As amostras foram classificadas de acordo com o tamanho dos cistos e trofozoítos baseados nos critérios de Page (1988) (PAGE, 1988).

4.7. Identificação Molecular dos gêneros de AVL

4.7.1. Extração de DNA

Para a extração de DNA total dos isolados foi utilizado o kit CPTBio DNA EXTRACTION (TECNOUNISC). O crescimento amebiano de três placas foi lavado e suspenso com PBS estéril em microtubo. Este foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O processo de extração do DNA foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante descritas a seguir.

Foram adicionados 180 µL de tampão de lise celular e as amostras foram submetidas ao banho-maria por 10 minutos a 100°C. Após foram adicionados 40 µL de Proteinase K e as amostras foram incubadas a 55°C por 3 horas. Posteriormente foram adicionados 600 µL de lise nuclear e as amostras novamente foram incubadas por 30 minutos a 65°C. Após a amostra foi centrifugada por 8 minutos a 13.000 rpm e foi transferido 600 µL do sobrenadante para um novo tubo que continha 600 µL de isopropanolol, misturando-o por inversão. Feito isso, as amostras foram centrifugadas por 4 minutos a 13.000 rpm e foi retirado o sobrenadante, com posterior adição de 600 µL de solução purificadora. As amostras foram centrifugadas novamente por 4 minutos a 13.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e foi realizada a inversão do tubo em papel absorvente. Feito isso, as amostras secaram durante a noite e no dia seguinte adicionou-se 100 µL de solução de reidratação de DNA.

4.7.2. Quantificação do DNA

A quantificação do DNA dos isolados de AVL foi realizada através do espectrofotômetro (NanoDrop™).

4.7.3. Reação em Cadeia da Polimerase

Os oligonucleotídeos específicos para cada gênero de AVL e para *Pseudomonas* spp., como bactéria endossimbionte, utilizados nas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR), estão descritos na Tabela 2.

As PCR foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo 20-30 ng de DNA, 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen®), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo, tampão de reação (50 mM KCl₂, 10 mM Tris-HCl), 1,5 mM MgCl₂, 1U de Taq polimerase (Invitrogen®) e água ultrapura estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore®). As amostras foram analisadas em um termociclador “Proflex™ 3×32 – Well PCR System – Life Technologies®”. As condições de amplificação também estão descritas na Tabela 1.

Todas as reações de amplificação foram padronizadas de acordo com os oligonucleotídeos utilizados. Adaptações foram realizadas em alguns componentes tais como: concentração do DNA, oligonucleotídeos, MgCl₂, temperatura de anelamento e número de ciclos.

Como controle negativo, foi adicionada água aos demais reagentes, no lugar do DNA. Isolados de referência de *Acanthamoeba castellanii* Neff (ATCC 30010), *Naegleria* (estirpe clonal), *Vermamoeba* (estirpe clonal), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 278532) *Legionella pneumophila* (isolado clínico) foram utilizados como controles positivos das reações. Após, os produtos da PCR foram analisados em eletroforese, com gel de agarose a 1,2%, corado com GelRed (Loading Buffer 5x –1 mL – Quatro G P&D Ltda) e visualizado sob luz ultravioleta com o fotodocumentador. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram analisados por comparação a um padrão de peso molecular de 100 pares de base (Ludwig® Biotecnologia, RS-Brasil).

Tabela 2. Descrição detalhada dos Oligonucleotídeos gênero-específico e condições de amplificação das PCRs.

Organismo	Gênero	Gene Alvo	Amplicon pb	Nome do primer	Sequência 5'-3'	Condições de amplificação	Referência
Amebas	<i>Acanthamoeba</i> spp.	18S rDNA	461	JDP1 JDP2	GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA TCTCACAAGCTGCTAGGGGAGTCA	94°C - 5 min + 35x 94°C - 1 min, 52°C - 1 min, 72°C - 1 min + 72°C - 5 min	Booton <i>et al.</i> , 2005
	<i>Naegleria</i> spp.	Região ITS (5.8 rDNA)	408-457	ITS1 ITS2	GAACCTGCGTAGGGATCATT TTTCTTTTCCTCCCCTTATTA	94°C - 3 min + 30x 94°C - 30 s, 55°C - 30 s, 72°C - 30 s + 72°C - 5 min	Pélandakis <i>et al.</i> , 2000
	<i>Vermamoeba</i> (<i>Hartmanella</i>) spp.	18S rDNA	502	Hv1227F Hv1227R	TTACGAGGTCAGGACACTGT GACCATCCGGAGTTCTCG	94°C - 5 min + 35x 94°C - 1 min, 52°C - 1 min, 72°C - 1 min + 72°C - 5 min	Kuiper <i>et al.</i> , 2006
Endossimbionte	<i>Pseudomonas</i> spp.	16SrDNA	618	PA-GS-F PA-GS-R	GACGGGTGAGTAATGCCTA CACTGGTGTTCCCTCCTATA	94°C - 5 min + 35x 94°C - 1 min, 52°C - 1 min, 72°C - 1 min+ 72°C - 5 min	Spilker <i>et al.</i> , 2004

4.7.4. Fluorescence in situ Hybridization (FISH)

A identificação e quantificação dos endossimbiontes foi realizada pela técnica de FISH de acordo com o protocolo descrito por Cottrell e Kirchmann (2000). Foi utilizada uma sonda de controle negativo (5'-CCTAGTGACGCCGTCGAC-3'), que não possui especificidade para nenhum grupo bacteriano, a fim de avaliar a eficiência da hibridização.

As amostras foram fixadas em paraformaldeído 30% diretamente na placa de incubação e filtradas em filtro branco de policarbonato Millipore de 0,22mm. Foram utilizados os marcadores fluorescentes Cy3 em sondas de oligonucleotídeos RNAr para identificação dos endossimbiontes conforme Tabela 3.

Tabela 3. Características das sondas marcadas com Cy3 utilizada para a identificação de micro-organismos.

Sonda	Especificidade	Sequência da sonda 5'-3'	Concentração de formamida (%v/v)	Referência
EUB338	Eubacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	30	Amann <i>et al</i> , 1990
NON	Controle negativo	CCTAGTGACGCCGTCGAC	30	Cottrell e Kirchman, 2000
ALFA968	Alfaproteobactérias	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	30	Amann <i>et al</i> , 1990
BETA42A	Betaproteobactérias	GCCTTCCCATTTCGTTT	30	Manz, <i>et al</i> , 1992
GAMA42A	Gamaproteobactérias	GCCTTCCCACATCGTTT	30	Manz, <i>et al</i> , 1992
PseaerA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GGTAACCGTCCCCCTTGC	30	Hogardt <i>et al.</i> , 2000

Após as amostras foram coradas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para a contagem da densidade bacteriana total. Os filtros foram, então, divididos em 10 partes, uma para cada sonda específica e a décima parte para a sonda negativa. Cada pedaço de filtro foi colocado em uma lâmina de vidro revestida com Parafilm® e coberta com 30 mL da solução de hibridização em uma concentração final de 2,5 ng/ μ L da sonda de oligonucleotídeo. A solução de hibridização era composta por 0,9 M de NaCl, 20 mM de Tris-HCL (pH 7,4), dodecil sulfato de sódio (DSD) a 0,01% e com concentração de formamida específica para cada bactéria. A amostra foi incubada a 42°C por uma noite. Após a hibridização, a amostra foi transferida para

uma solução de lavagem, contendo 20 mM de Tris-HCL (pH 7,4), 5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), DSD a 0,01% e uma concentração de NaCl apropriada para cada sonda específica e então a amostra foi incubada a 48°C por 15 minutos. As células bacterianas foram coradas com 2 µg/mL de DAPI sendo então possível avaliar a densidade bacteriana total. Cada pedaço do filtro foi imerso em etanol 80% (v/v) por três vezes e deixado para secar. Finalmente então, a lâmina foi montada utilizando glicerol e Vectashield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) na proporção de 4:1. As células bacterianas totais e de cada espécie foram contadas utilizando-se um microscópio de epifluorescência Olympus BX60 equipado com o filtro 41007a para o marcador Cy3 e o filtro 31000 para DAPI, no aumento de 1000x.

A contagem foi realizada em dez campos aleatórios. O número final de bactérias foi calculado pela multiplicação das diluições realizadas durante o tratamento da amostra. O percentual de cada espécie em relação à contagem das células bacterianas totais foi calculado. Os resultados foram expressos em céls/mL.

Purificação do produto de PCR

O produto da PCR foi purificado segundo o protocolo do kit de purificação PureLink (Invitrogen®). Foi adicionado 200µL de tampão de purificação Purilink binding buffer ao tubo contendo o produto da PCR. A solução foi homogeneizada e transferida para a coluna de purificação, centrifugada a 5000 x g por 1 minuto e o conteúdo do filtrado descartado. No centro da coluna foi adicionado então 650 µL do tampão de lavagem Purilink wash buffer e centrifugado novamente a 5000 x g durante 1 minuto. Este novo filtrado foi descartado e a coluna foi centrifugada por mais 3 minutos a 5000 x g. Todo o filtrado foi descartado. A coluna foi então transferida para tubo tipo eppendorf com capacidade para 1,5 mL, onde foi adicionado 13 µL do tampão de separação de DNA Purilink Elution Buffer (Invitrogen®).

Após um minuto de incubação à temperatura ambiente, a coluna foi centrifugada por 2 minutos a 5000 x g. O volume separado foi coletado e depositado novamente no centro da coluna. Após 2 minutos de centrifugação a 5000 x g, o volume eluído foi quantificado em espectrofotômetro Shimadzu UV-160 a 260 nm e 3 µL foram aplicados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, para visualização da qualidade das bandas.

Reação de Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado segundo a técnica clássica descrita por Sanger em 1977) e posteriormente modificada por Karger em 1996 (SANGER, 1977; KARGER, 1996).

Foi utilizado o kit Big Dye terminator (Applied Biosystems®) em um sistema de 10 µL contendo: 0,5 µL de Big Dye Terminator; 0,5 µL de Tampão 2,5X (200 mM TrisHCl e 5 mM MgCl₂), 5 pmoles do iniciador universal JDP1 ou reverso JDP2 e 30 ng de DNA purificado. As condições da reação foram de desnaturação inicial à temperatura de 94 °C durante 1 minuto; 45 ciclos de desnaturação à temperatura de 94 °C por 10 segundos, anelamento à temperatura de 60 °C por 7 segundos e extensão à temperatura de 60 °C durante 3 minutos, em termociclador Biocycler, ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Ao volume amplificado foi adicionado 60µL de isopropanol 75% e misturado em homogeneizador. Após um período de 20 minutos à temperatura ambiente, foi centrifugado a 5000 x g durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao conteúdo restante foi adicionado 190µL de etanol 65%. Após mais 20 minutos de centrifugação a 5000 x g, o sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o produto foi incubado em estufa a 37 °C para secagem. Estes produtos foram colocados no sequenciador automático.

Análise das sequências de DNA

As sequências foram analisadas e corrigidas utilizando o programa Staden Package (http://staden.sourceforge.net/staden_home.html) e alinhadas no programa CLUSTAL-W versão 1.8 – Clustal: Multiple Sequence Alignment (<http://www.clustal.org/>) e no MEGA 3 – Molecular Evolutionary Genetics Analysis (<https://www.megasoftware.net/>).

Genotipagem de *Acanthamoeba* spp.

As sequências nucleotídicas obtidas a partir da amplificação dos isolados para o fragmento do gene 18S rDNA, foram comparadas quanto a maior porcentagem de similaridade com as sequências nucleotídicas dispostas no banco de dados nucleotídicos do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) por meio do algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Para indicar as possíveis espécies dos isolados, as sequências nucleotídicas foram comparadas com as sequências das demais

espécies de *Acanthamoeba* spp. que também estão dispostas no site da NCBI, seguindo a mesma metodologia.

4.8. Análise Estatística

Os dados foram coletados e armazenados em uma planilha de dados no software Excel. Os valores foram expressos como médias \pm desvio padrão (DP) ou números e porcentagens. As médias foram comparadas pelo teste ANOVA. Para a comparação de grupos de variáveis categóricas foi utilizado o qui-quadrado ou o teste exato de Fisher.

Foi utilizado um intervalo de confiança de 95%, portanto valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4.9. Considerações Éticas

Este estudo foi realizado conforme a resolução 466/12 CNS, sendo respeitados os preceitos éticos dos indivíduos participantes. O mesmo faz parte de um projeto maior intitulado como: “Desenvolvimento de métodos moleculares no diagnóstico de *Micro-organismos* e genes envolvidos na resistência bacteriana”, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Jane Dagmar Pollo Renner, aprovado pelo CEP/UNISC, sob parecer de nº: 1.540.110/2016 e CAAE: 55494716.3.0000.5343 (ANEXO).

5. ARTIGO 1

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Environmental Microbiology and Environmental Microbiology Reports

Manuscript ID

EMIR-2019-0390

Title

Cocurrence of Acanthamoeba spp. and Pseudomonas spp. in air conditioning system in a Hospital of Southern Brazil

Authors

bulle, danielly

jacobs, Helena

Alves, Paulo

BENITTEZ, LISIANNE

CESAR, DIONEIA

Brittes Rott, Marilise

Date Submitted

16-Mar-2019

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2019. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)

1 **Cooccurrence of *Acanthamoeba* spp. and *Pseudomonas* spp. in air conditioning system in**
2 **a Hospital of Southern Brazil**

3
4 Danielly Joani Bullé^{1,2}; Helena Beatriz Jacobs²; Paulo Roberto Alves²; Dionéia Evangelista
5 Cezar³; Lisianne Brittes Benittez⁴; Marilise Brittes Rott^{1,5}
6

7 **Affiliations:**

8 ¹ Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal
9 do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

10 ² Departamento de Biologia e Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do
11 Sul, RS, Brazil.

12 ³ Departamento de Ecologia e Biologia Molecular de Microrganismos, Instituto de Ciências
13 Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

14 ⁴ Mestrado em Tecnologia Ambiental da Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul,
15 RS, Brazil.

16 ⁵ Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da
17 Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

18

19 **Corresponding author:**

20 Marilise Brittes Rott

21 Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto
22 Alegre, RS, [Brazil](#).

23 Marilise.rott@ufrgs.br +55 51 37131798

24

25 **Running title:** FLA and endosymbionts in hospital environment

26 **Summary**

27

28 Free-living amoebae (FLA) are unicellular protozoa, distributed in different habitats and able
29 to survive in extreme conditions of temperature and pH. *Acanthamoeba*, *Naegleria* and
30 *Balamuthia* are the main genera considered potentially pathogenic (PP). FLA nutrition occurs
31 through phagocytosis, mainly of bacteria, that can replicate within these microorganisms and
32 become resistant to amoebae. The objective of the present study was to determine the presence
33 of FLA, their pathogenic potential and relationship with endosymbionts in the air conditioner
34 dust from a teaching hospital in the city of Santa Cruz do Sul, Southern Brazil. Monoxenic
35 cultures, morphological identification (Page, 1988), exflagellation test, pathogenic potential
36 (*thermo- and osmotolerance* tests) and molecular identification (PCR, sequencing and FISH)
37 were performed. From the 234 samples surveyed, 170 (72.6%) presented amoebic growth,
38 being identified as *Acanthamoeba* spp. Of these, 122 (71.8%) were characterized as PP and 123
39 (72.4%) were identified as belonging to the T4 genotype. From the 54 *Acanthamoeba* spp. T4
40 genotype isolated from intensive care unit (ICU), 18 (33.3%) presented positive results for
41 *Pseudomonas* spp. as endosymbionts. Therefore, the present study detected high prevalence of
42 PP FLA in the air conditioner system from HSC and serves as an alert to the possibility of
43 nosocomial infections by these microorganisms.

44

45 Keywords: Amoeba; potentially pathogenic; hospital; air conditioner filter dust.

46

47 **Introduction**

48 Free-living amoebae (FLA) are unicellular protozoa considered to be potentially pathogenic
49 agents capable of causing severe and fatal infections, such as keratitis and encephalitis. They
50 can be found in different habitats such as soil, water, dust and hospital environments and they
51 can survive to extreme temperatures and pH conditions (TRABELSI et al., 2015).

52 FLA nutrition occurs through phagocytosis of several different microorganisms, mainly
53 bacteria that can resist to the process and multiply inside the amoebae (OVRUTSKY et al.,
54 2013).

55 The association between bacteria and amoebae make them resistant to most disinfection
56 processes and to several water treatments applied to the hospital environment, posing a serious
57 public health problem (DELAFONT et al., 2016; TRABELSI et al., 2015).

58 Some FLA species are considered potentially pathogenic to humans because they can
59 survive inside the host in a variety of habitats (MAJID et al., 2017). Several bacterial species
60 have been associated with these protozoa, for instance *Mycobacterium avium*, *Listeria*
61 *monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila*
62 (BALCZUN; SCHEID, 2017; DELAFONT et al., 2016; GREUB; RAOULT, 2004; THOMAS
63 et al., 2010). Accurate and early diagnosis of infections caused by FLA and their
64 endosymbionts, in addition to implementation of adequate prevention and control measures is
65 imperative, since their incidence has been increasing every year all over the world (MUCHESA;
66 BARNARD; BARTIE, 2015; TRABELSI et al., 2015).

67 Therefore, according to the above exposed, the aim of this study was to isolate and
68 characterize morphologically and molecularly FLA from air conditioner dust in a hospital
69 environment, and investigate the presence of endosymbiotic bacteria. Along to that, this is the
70 first study aiming to isolate potentially pathogenic FLA and their endosymbionts in air
71 conditioner dust samples from a teaching hospital in the countryside of Rio Grande do Sul State,

72 Brazil.

73

74 **Results and Discussion**

75 **Isolation of FLA from air conditioner dust samples**

76 In a hospital environment, 234 dust samples from air conditioners were collected and
77 cultured. Amoeba growth was detected in 170 samples (72.6%). Results are described in **Table**
78 **1**.

79 FLA frequency of isolation in the present study was the highest reported in studies
80 carried out in hospitals in Brazil (da Silva and da Rosa, 2003; Costa *et al.*, 2010; Carlesso *et*
81 *al.*, 2010). During monoxenic culture initial phase, high rate of contamination was observed,
82 mainly by filamentous fungi and bacteria. Contaminants were removed after several subcultures
83 and only FLA cysts and trophozoites remained, free from contaminants (**Figure 1**).

84 FLA isolation frequency was significantly lower in the Operating Room when compared
85 to the other sites studied ($p<0,001$) and there was no significant difference among the other
86 sites. The lowest positivity observed in the Operating Room can be related to the fact that this
87 site assists high-risk patients. Besides a great concern with cleaning and disinfection of this site,
88 usually a fewer number of professionals have access to the room and they usually wear personal
89 protective equipment (PPE) such as gloves, masks, caps, shoe covers and appropriate sterilized
90 gowns. All these precautions could contribute to lowering contamination in those
91 environments and should be enforced since it is known that *Acanthamoeba* spp. have been
92 isolated as normal microbiota from the upper respiratory tract of apparently healthy individuals
93 (DA SILVA; DA ROSA, 2003a).

94 Literature related to studies about FLA identification from dust samples is scarce,
95 despite of the fact that such infections are being more frequently reported, usually with late
96 diagnosis and often leading to patient's death. Studies have been carried out all over the world

97 and mostly include samples from different water sources, where the majority of them has the
98 same objective, which is to reduce contamination sources, assist fast diagnosis and avoid fatal
99 cases (LIANG et al., 2010; MAJID et al., 2017).

100

101 **Morphological Characterization of isolates**

102 All positive samples presented morphological characteristics suggestive of
103 *Acanthamoeba* spp. Trophozoites presented acanthopodia, slow locomotion and contractile
104 vacuoles in their cytoplasm with hyaline peripheral zone (**Figure 2**).

105 Cysts presented a mean size of less than 18 μm , their endocysts were double-walled,
106 stellate, polyhedral or triangular, and the ectocyst were smooth or wavy. All the characteristics
107 presented by the isolates were compatible with Group II according to Page (1988)
108 morphological criteria.

109 Cysts mean size (10 cysts measured by sample) ranged from 11.1 to 15.1 μm , with a
110 mean of 12.74 ± 1.03 . There was no difference in endocysts mean size among different shapes
111 ($p= 0.78$ e $p=0.46$, respectively). All shapes were found in the different collection sites. Results
112 are summarized in **Table 2**.

113 Carlesso *et al.* (2007) collected 135 samples from dust and biofilm in different hospital
114 environments in the city of Porto Alegre/RS. FLA were identified in 47 samples and 16 were
115 suggestive of *Acanthamoeba* spp. Cysts were double-walled with triangular, estellate or
116 polygonal endocysts and wrinkled ectocysts.

117 In the city of Curitiba/PR, Costa *et al.* (2010) collected dust samples from different
118 hospital sites and all of them presented amoebic growth. Isolates presented trophozoites with
119 acanthopodia and contractile vacuoles as well as double-walled cysts with endocysts,
120 compatible with group II according to Page's (1988) criteria.

121 FLA contamination in hospital environments, which have immunosuppressed patients,

122 represents a serious health risk for them. *Acanthamoeba* spp. occurrence in a variety of settings
123 is due to a high availability of “food” for amoebae. Microorganisms such as bacteria and fungi
124 are present in the form of droplets in the air. This explains why it is so difficult to isolate amoebae
125 in monoxenic cultures, requiring repeated subcultures in order to obtain solely FLA
126 trophozoites and cysts, free from any contaminants.

127

128 **Exflagellation test**

129 This test was performed for *Naegleria fowleri* identification in the 170 samples that presented
130 amoebic growth and the result was negative for all samples tested. This test was performed to
131 verify the emission of flagella. The transformation to the flagellar phase is transient, and it is
132 known that the flagella facilitate the dispersion of the amoeba in the environment for nutrients
133 search (TRABELSI et al., 2012). A similar result was presented by Carlesso *et al.* (2007), which
134 isolates didn't present the emission of flagella. Both studies are not isolated cases, since Lasjerdi
135 *et al.* (2011) also failed to isolate *Naegleria fowleri*, and reported the difficulty of isolating these
136 FLA, due to their lower prevalence in the environment and their susceptibility to the
137 disinfectants used, as well as being less resistant to desiccation. The presence of *Naegleria* cysts
138 occurs more frequently in mud and its presence in samples from a hospital environment is rare.
139 Da Silva and da Rosa (2003) carried out the exflagellation test for isolates of dust samples from
140 hospital environments, identifying the emission of flagella in five samples from 65 FLA
141 positive isolates, characterizing the suggestive presence of the *Naegleria fowleri*.

142

143 **Physiological tests: thermotolerance and osmotolerance**

144 In the thermotolerance test, 170 isolates from all studied

145 environments have grown at 30°C, 37°C and 42°C and there was a 100% increase in 30°C and
146 37°C temperatures. At the 42°C the culture was positive in 154 (90.6%) samples and negative
147 in 16 (9.4%) samples.

148 In the osmotolerance test, the same 170 isolates were tested. All of them were positive
149 in 0.5M Mannitol medium and negative at the 1.5M Mannitol concentration. However, 130
150 (76.5%) were positive and 40 (23.5%) isolates were negative at 1.0 M Mannitol concentration.

151 The pathogenic potential was evaluated according Khan *et al.* (2001). Of the total, eight
152 (4.7%) isolates were non-pathogenic, 40 (23.5%) had low pathogenic potential and 122 (71.8%)
153 were potentially pathogenic. **Table 3** shows the distribution of the potentially pathogenic
154 isolates according to the isolation sites. There was no significant difference in the potentially
155 pathogenic FLA frequency among the sites studied ($p= 0.35$).

156 Thermotolerance and osmotolerance tests were performed in order to evaluate the FLA
157 pathogenic potential. The osmolality test was performed to verify the ability to tolerate different
158 mannitol molar concentrations, indicating that potentially pathogenic amoebae may grow even
159 at higher osmotic pressures. Our study verified that 70% of the isolates were classified as PP,
160 differing from the results found in the literature especially in hospital environments, which
161 show us the importance of reevaluation of disinfection methods. The study accomplished by
162 Costa *et al.* (2010) presented similar results as those presented in the present study, with higher
163 growth at 37°C and lower growth at 42°C. Lasjerdi *et al.* (2015), isolated dust and biofilm
164 samples from an ophthalmologic unit in an Iran hospital, where all the positive isolates for *FLA*
165 showed growth at temperatures of 30°C and 37°C, and only three isolates presented growth at
166 42°C.

167

168

169 **Molecular identification of FLA genera and determination of *Acanthamoeba* species and**

170 **genotypes**

171 Oligonucleotides specific for *Acanthamoeba* spp., *Naegleria* spp. and *Vermamoeba*
172 (*Hartmanella*) spp., were used for FLAs molecular identification. All 170 isolates were
173 identified as *Acanthamoeba* spp. (**Figura 4**) Three different species were identified by DNA
174 sequencing: *A. castellanii*, *A. culbertsoni* and *A. polyphaga* being the first one the most
175 prevalent for all hospital sites (72.9%) (**Table 4**).

176 The study realized by Crozetta (2007) and published by Costa *et al.* (2010) also
177 confirmed the genus *Acanthamoeba* in all isolates using the PCR identification at the Hospital
178 de Clínicas of UFPR (Curitiba city-Paraná), presenting higher frequency of FLA when
179 compared to our study. However, the isolates number (30 isolates) of that study was lower than
180 ours.

181 Carlesso *et al.* (2010) evaluated the pathogenic potential of *Acanthamoeba* spp. isolated
182 from another hospital in Brazil, and in 135 samples collected, 35% were positive for FLA, of
183 these 23% were characterized as belonging to the genus *Acanthamoeba*.

184 Worldwide, Rohr *et al.* (1998) investigated the presence of FLA in six hospitals in
185 Germany and found them in about 56% of hot water samples and 47% in toilets, with
186 *Acanthamoeba* and *Naegleria* being the most frequent FLA. In a study performed at the hospital
187 in Tunisia by Trabelsi *et al.* (2016), it was evaluated the FLA presence in water samples,
188 obtaining 64.2% of *Acanthamoeba* genus identified by PCR. Khurana *et al.* (2015), analyzed
189 water samples from a tertiary care hospital in India, and only four samples were molecularly
190 identified as belonging to the genus *Acanthamoeba*. In the study accomplished by Lasjerdi *et*
191 *al.* (2011), 70 dust and biofilm samples from the transplant, pediatric neoplasms, HIV, leukemia
192 and cancer services from five university hospitals in Iran were analyzed. The frequency of FLA
193 found was 52.9% being *Acanthamoeba* genus the most prevalent.

194 In our study 123 (72.4%) of *Acanthamoeba* spp. were identified as belonging to the T4

195 genotype, 54 (44%) of which were restricted to the ICU environment (adult and pediatric). The
196 other 27.6% correspond to the genotypes (T3, T5 and T11) (**Table 5**).

197 The four genotypes identified here have a wide environmental distribution reported in
198 soil samples (Booton *et al.*, 2004; Todd *et al.*, 2015; Reyes-batlle *et al.*, 2016), water (Booton
199 *et al.*, 2004; Caumo and Rott, 2011; Sente *et al.*, 2016) and dust (NIYYATI *et al.*, 2009).

200 The genotype T3 is less prevalent in the environment when compared to T4 or T5, being
201 considered practically non-pathogenic (EDAGAWA *et al.*, 2009; LEDEE *et al.*, 2009), although
202 there are some reports showing pathogenicity (BOOTON *et al.*, 2009; MAGHSOOD, 2005;
203 NAGYOVÁ; NAGY; TIMKO, 2010; STOTHARD *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 2004).

204 Isolates of the T5 genotype are basically free-living, although there are reports in the
205 literature saying that this strain has been isolated in patients with keratitis and disseminated
206 infection by *Acanthamoeba* (BARETE *et al.*, 2007; SPANAKOS *et al.*, 2006).

207 The T11 genotype has also been related to amoebic keratitis cases (Lorenzo-Morales *et*
208 *al.*, 2015) and was associated with this kind of infection in a survey conducted in Austria that
209 evaluated past 20 years cases (WALOCHNIK; SCHEIKL; HALLER-SCHOBBER, 2015).

210 The T4 genotype was the most prevalent in our study and the same result was evidenced
211 in previous studies. Rahdar *et al.* (2012) verified the predominance of this genotype in soil and
212 water isolates obtained from Iran. Likewise, Geisen *et al.* (2014) reported the predominance of
213 T4 genotype in *Acanthamoeba* isolates from soil samples from the Netherlands, Sardinia and
214 Tibet. It is the genotype most associated with keratitis and amoebic encephalitis cases, as well
215 other opportunistic infections caused by this protozoan (AICHELBURG *et al.*, 2008;
216 SIDDIQUI; KHAN, 2012; WALIA *et al.*, 2007).

217 In the study by Trabelsi *et al.* (2015) 53.5% of water samples from a hospital reservoir
218 were positive for AVL, about 47.6% of them were from the genus *Acanthamoeba*, with the T4
219 genotype being the most prevalent. Globally, this genotype is predominant in environmental

220 samples and is frequently related to *Acanthamoeba* keratitis cases (CARLESSO et al., 2010b;
221 DENDANA et al., 2013; KAO et al., 2013).

222 Studies that evaluated the presence of *Acanthamoeba* in dust and soil samples showed
223 results similar to ours, reporting the presence of the T3, T4, T5 and T11 genotypes, with a
224 predominance of T4 (NIYYATI et al., 2009; TODD et al., 2014), as well in studies based on
225 air-conditioning systems from Chile (ASTORGA et al., 2011) and Malaysia (CHAN et al.,
226 2011).

227 There are few reports in the literature about *Acanthamoeba* spp. isolation in hospitals,
228 despite the importance of these microorganisms as propagators of opportunistic infections and
229 for the pathogens spread (KOCAZEYBEK, 2015). Carlesso *et al.* (2010) described the
230 presence of T4 genotype in dust samples and the T5 genotype in biofilm samples from hospital
231 environments in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. In an investigation carried out in
232 Austria based on the presence of FLA and bacteria in hospital refrigeration systems, they
233 reported the presence of *Acanthamoeba* T4 genotype with amoebic resistant bacteria inside
234 them, emphasizing the importance of these amoebae as bacterial vehicles (SCHEIKL et al.,
235 2016).

236 The genotypes identified in the present study (T3, T4, T5 and T11) are therefore
237 associated with cases of human infections, with T3 being in the lowest proportions (SIDDIQUI;
238 KHAN, 2012; WALOCHNIK; SCHEIKL; HALLER-SCHOBBER, 2015). Knowing the
239 opportunistic nature of *Acanthamoeba* spp. and considering the high prevalence of T4 genotype
240 in intensive care units, the results showed in our study deserves special attention from hospital
241 staff, since these environments attend immunocompromised susceptible patients.

242 **Endosymbiotic bacteria identification**

243 All 170 *Acanthamoeba* spp. isolates were tested by PCR for the presence of *Pseudomonas*,
244 *Mycobacterium* and *Legionella* spp. as endosymbionts. *Pseudomonas* spp. was identified in 40

245 (23%) of the 170 *Acanthamoeba* spp (**Figura 5**). isolates from air conditioner dust and 31
246 (77.5%) of these were potentially pathogenic. All 170 *Acanthamoeba* spp. isolates were
247 negative for the presence of *Mycobacterium* spp. and *Legionella* spp. as endosymbionts by
248 PCR. Regarding to the distribution, 24 (67.8%) *Pseudomonas* spp. positive samples were
249 isolated in ICU, of these 19 isolates of *Acanthamoeba* spp. were potentially pathogenic (**Table**
250 **6**). We compared the *Pseudomonas* spp. frequency in *Acanthamoeba* spp. in different
251 environments and no significance was found ($p= 0.061$), which may be related to the small
252 absolute number of positives samples when stratified by environment. When COZ (lower
253 positivity) was comparing with UTIAD and UTIPED (higher positivity) there was a significant
254 difference in *Pseudomonas* spp. frequency ($p= 0.020$ and $p= 0.021$, respectively).

255 In our study, of the 54 *Acanthamoeba* spp. T4 genotype isolated from adult and pediatric
256 ICU, 18 (33.3%) presented positive results for *Pseudomonas* spp. as endosymbionts. The
257 presence of *Pseudomonas* spp. as amoebic resistant bacteria (ARB) has been described in some
258 studies. Iovieno *et al.* (2010) reported the presence of ARB in *Acanthamoeba* isolates obtained
259 from patients with amoebic keratitis. From the 37 isolates, 22 (59.4%) had ARB, of which 13
260 (35.1%) belonged to the genus *Pseudomonas*. In a hospital in Germany it was also verified the
261 existence of *Pseudomonas* spp. in potable water samples (MICHEL; BURGHARDT;
262 BERGMANN, 1995). In Brazil, a study carried out in Rio Grande do Sul, the researchers
263 identified *Pseudomonas* in all 12 isolates of *Acanthamoeba* spp., which came from air
264 conditioners and contact lens cases (MASCHIO; CORÇÃO; ROTT, 2015).

265 *Acanthamoeba* species and bacteria of *Pseudomonas* genus have wide distribution in
266 nature and the presence of them in the same habitat provides their interaction. *Acanthamoeba*
267 spp. feed on bacteria and in this process *Pseudomonas* spp. become resistant by unknown
268 mechanisms, remaining inside the amoeba (GREUB; RAOULT, 2004; TASHIRO;
269 UCHIYAMA; NOMURA, 2012). *Pseudomonas* species are among the bacteria frequently

270 associated with nosocomial infections, mainly causing respiratory and skin infections in
271 immunocompromised patients (PELEG; HOOPER, 2010). Antimicrobial resistant isolates are
272 also frequently reported (TASHIRO; UCHIYAMA; NOMURA, 2012).

273 In a retrospective study conducted at the same teaching hospital studied (June 2008 to
274 May 2009), 23.0% of *Pseudomonas* spp. carbapenem resistant were isolated. Renner and
275 Carvalho (2013) evaluated the presence of microorganisms on surfaces of the adult ICU of that
276 hospital, where only *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* were detected. No
277 single sample of *Pseudomonas* spp. was isolated on that study. However, Jahn *et al.* (2017)
278 analyzed 54 *P. aeruginosa* isolates from individuals seen in that hospital. A possible
279 explanation for the absence of *Pseudomonas* spp. in the environmental samples, knowing that
280 there is a high frequency of nosocomial infections in that hospital caused by this
281 microorganism, is that when these bacteria are inside the amoeba, these endosymbionts are
282 harder to isolate, being necessary the coculture technique (EVSTIGNEEVA *et al.*, 2009;
283 THOMAS *et al.*, 2006).

284

285 ***Fluorescence in situ Hybridization (FISH)***

286 FISH technique was performed for a randomly selected subgroup of 46 samples. All
287 were positive for the EUB338 probe, indicating the presence of bacterial endosymbionts. Of
288 these, nine (19.6%) samples were negative for the three probes of bacterial groups tested. Two
289 (4.4%) samples were positive only for the Alphaproteobacteria group, three (6.5%) were
290 positive only for the Betaproteobacteria group and six (13%) were positive for Alpha and Beta,
291 simultaneously. The other 26 (56.5%) samples were positive only for the probe of the
292 Gamaproteobacteria group and all 26 (56.5%) were positive for the *Pseudomonas aeruginosa*
293 specific probe, visualized in **Figure 3**.

294 When FISH results for *P. aeruginosa* species were compared with those obtained by

295 PCR technique for *Pseudomonas* genus, there was agreement of 93.5% among the
296 methodologies. Among the three discordant samples, one sample was positive in the FISH
297 technique for the *P. aeruginosa* species and negative in the PCR for the genus. The other two
298 samples were positive for the genus (PCR) and negative for the probe of the group
299 Gamaproteobacteria, where the genus *Pseudomonas* is inserted. Possibly these disagreements
300 are related to the difference in the sensitivity/specificity from techniques used.

301

302 **Conclusions**

303 The present study detected high prevalence of potentially pathogenic FLA, in addition
304 to an important frequency of *Pseudomonas* spp. as endosymbiont when compared to other
305 studies already performed using dust, biofilms and water in hospital settings

306 In the present study, *Pseudomonas* spp. was the main genus to be investigated as
307 possible FLA endosymbiont because there is a clinical concern about infecting patients in the
308 hospital studied (JAHN et al., 2017; KRUMMENAUER et al., 2010).

309

310 **Experimental Procedures**

311

312 **Study location and sampling**

313 Samples were collected from a teaching hospital (232-bed) in the city of Santa Cruz do
314 Sul, southern Brasil.

315 Between March 2015 and December 2016, 234 dust samples were randomly collected
316 from air conditioner filters as follows: 40 from the Adult Intensive Care Unit (AICU), 60 from
317 the Kitchen (KIT), 32 from the Outpatient Care Sector (OCS), 52 from the Operating Room
318 (OR) and 50 from Pediatric ICU (PICU) from the teaching hospital.

319 Hospital infection control measures include air conditioner filters cleaning every two

320 weeks by trained personnel from the hospital maintenance company. Study samples were
321 collected using a dry and sterile swab, rubbed randomly over every air conditioner filter from
322 the room before cleaning by the maintenance staff. Every swab was placed into an identified
323 tube containing 2mL of sterile distilled water and was later transported to the laboratory of
324 Parque Científico e Tecnológico Regional (TECNOUNISC) at Universidade de Santa Cruz do
325 Sul, sothern Brasil. Samples were processed as described by De Carli (2001).

326

327 **Monoxenic Culture for the Isolation of FLA**

328 After vortexing and disposal of swabs, samples were centrifuged and the sediment was used to
329 inoculate the plates. The inoculum consisted of 100µL added to the center of a plate containing
330 1.5% non-nutrient agar (Agar Page) seeded with an *Escherichia coli* (ATCC 11775) heat
331 inactivated suspension, sealed with Parafilm® and incubated at 30°C for 10 days. All
332 procedures were performed in triplicates. Subcultures were conducted aiming to isolate FLA
333 and stop fungal contaminants. Amoeba trophozoites and cysts were examined by optical
334 microscopy (10x and objective) according to described by Page (PAGE, 1988), adapted by
335 Khan (2006).

336

337 **Exflagellation test**

338 For the identification of *Naegleria fowleri* the exflagellation test was conducted when
339 monoxenic cultures with trophozoitic forms were identified. Briefly, Agar Page plates' surface
340 were covered with 10mL of sterile distilled water and smoothly scraped off with a loop to obtain
341 a FLA suspension. The suspension was placed into sterile cell culture bottles and incubated at
342 37°C. Using an inverted light microscope, bottles were examined for the emission of flagella
343 every 30 min. For 4 hours. Negative samples were observed for up to 24 hours and then
344 discarded (DE CARLI, 2001).

345 **FLA pathogenic potential identification**

346 **Thermotolerance and Osmotolerance Assays**

347 For temperature tolerance assays, plates containing monoxenic amoebae cultures were exposed
348 to 30°C, 37°C and 42°C for 10 days. 30°C is the optimal temperature for FLA growth and was
349 used as control. Procedures were performed in triplicate in plates containing 1.5% non-nutrient
350 agar (Agar Page) seeded with *E. coli* heat inactivated suspension . FLA growth was represented
351 as: (-) absence of growth and (+) indicating amoebic growth. All plates were examined daily
352 for 10 days (NEFF; NEFF, 1969).

353 For osmolality tolerance assays, plates containing non-nutrient agar (used as a control)
354 and plates containing non-nutrient agar with 0.5 M, 1.0 M and 1.5 M mannitol were previously
355 covered with heat inactivated *E. coli* and incubated at 56°C for 24h. 1000 trophozoites per 25
356 µL of suspension, volume that was seeded in the central area of a plaque. Plates were incubated
357 at 30°C for 120h. At intervals to 12 and 24 hours over 120 hours the diameter of the halo (in
358 millimeters) on the agar surface was measured, which was the amoeba growth and bacteria
359 consumption. Standard strain ATCC 30461 (*A. polyphaga*) was used as a positive control. All
360 tests were performed in triplicate.

361

362 **Morphological Characteristics of FLA**

363 The samples were classified according to the cysts and trophozoites sizes and morphology
364 based on Page (1988) criteria.

365

366

367 **Molecular analysis of FLA**

368 **DNA Extraction**

369 Three plates of amebic growth were washed and suspended in microtube with sterile PBS, after
370 the material eluted was centrifuged at 2500 rpm for 10 minutes and the supernatant was
371 discarded. DNA extraction was performed from the cells pellets using CPTBio DNA
372 EXTRACTION kit (TECNOUNISC) according to the manufacturer's recommendations. DNA
373 concentration was determined using a NanoDrop™ spectrophotometer.

374

375 **Polymerase Chain Reaction**

376 PCR amplification reaction was performed in final volume of 25 µl using Proflex™ 3×32 Well
377 PCR System thermal cycler (Life Technologies). The amplification conditions are described in
378 Table 5. The reaction mixture contained 20-30 ng DNA, 0.2 mM dNTP (Invitrogen®), 0.4 µM
379 of each specific oligonucleotides for FLA genera, *Pseudomonas* spp., *Legionella* spp. and
380 *Mycobacterium* spp. (also described in Table 5), reaction buffer (50 mM KCl₂, 10 mM Tris-
381 HCl), 1.5 mM MgCl₂, 1 U Taq polymerase (Invitrogen®) and sterile ultrapure water
382 (MilliQPlus, Millipore®). *Acanthamoeba castellanii* Neff (ATCC 30010), *Naegleria* (clonal
383 strain), *Vermamoeba (Hartmanella)* (clonal strain), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853),
384 *Legionella pneumophila subsp. pneumophila* (ATCC®33152™) and *Mycobacterium sp.*
385 (ATCC® 29472™) reference isolates were used as positive controls. In the negative control,
386 water was added to the other reagents. Finally, PCR products were analyzed by electrophoresis
387 in a 1.2% GelRed agarose (Loading Buffer 5x -1 mL - Quatro GP & D Ltda) using 100 base
388 pairs standard molecular weight (Ludwig Biotechnology, RS-Brazil) and visualized in UV
389 light.

390

391

392 **Sequencing, Nucleotide Alignment and Genotyping**

393 DNA from cultures identified as positive for *Acanthamoeba* spp. by PCR was extracted using

394 the CPTBio DNA EXTRACTION kit (TECNOUNISC) method as previously described. Gene
395 amplifications of the 18S rDNA were also performed as previously described in Table 5
396 (BOOTON et al., 2005; SCHROEDER et al., 2001). PCR products were purified using the
397 PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen™) and sequenced using the AB 3500 Genetic
398 Analyzer (Applied Biosystems) automatic sequencer armed with 50 cm capillaries and POP7
399 polymer (Applied Biosystems) performed by ACTGene Análise Moleculares Ltda. company
400 (Biotechnology Center, UFRGS, Porto Alegre, RS). Sequence alignment was performed using
401 the Chromas Version 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd). Genotype identification was based on
402 sequence analysis of 18S rDNA region as previously described (BOOTON et al., 2005;
403 SCHROEDER et al., 2001) by comparison to the available *Acanthamoeba* DNA sequences in
404 Genbank.

405

406 **FISH**

407 The endosymbionts identification was performed by FISH technique according to the Cottrell
408 and Kirchman (2000). The negative control probe (5'-CCTAGTGACGCCGTCGAC-3') has no
409 specificity for any bacterial group. The samples were fixed directly on the incubation plate in
410 30% paraformaldehyde and filtered in Milipore polycarbonate white filter (0.22 mm). RNAr
411 oligonucleotide probes were marked with Cy3 fluorescent to identify endosymbionts (Table 6).

412 After, the samples were DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) stained. The filters were
413 divided into 10 parts, for each specific probe and the negative probe. A piece of the filter was
414 placed on a Parafilm® coated glass slide and covered with 30 ml of hybridization solution at
415 2.5 ng/μL final concentration of the oligonucleotide probe. The hybridization solution contains
416 0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCL (pH 7.4), 0.01% sodium dodecyl sulfate (DSD) and the
417 concentration of formamide determined to achieve specificity for the targeted group of bacteria.
418 The sample was incubated at 42°C overnight. After hybridization, the sample was transferred

419 to a wash solution containing 20 mM Tris-HCL (pH 7.4), 5 mM ethylenediamine tetra acetic
420 acid (EDTA), 0.01% DSD and a concentration of NaCl appropriate for the probe. Then the
421 sample was incubated at 48°C for 15 minutes. A total bacterial density was evaluated with 2
422 µg/ml DAPI stained. Each filter piece was immersed in 80% (v/v) ethanol three times and then
423 dried.

424 The slide was assembled using 4:1 glycerol and Vectashield (Vector Laboratories Inc.,
425 Burlingame, CA, USA). Each species cells were counted using Olympus BX60 epifluorescence
426 microscope with the 41007a filter for Cy3 marker and the 31000 filter for DAPI at 1000x
427 magnification.

428

429 **Statistical analysis**

430 Data were collected and stored in Excel software spreadsheets. Values were expressed as means
431 ± standard deviation (SD) or numbers and percentages. The means were compared by the
432 ANOVA test and for the groups comparison of categorical variables the chi-square or the
433 Fisher's exact test was used. A 95% confidence interval was used, therefore *p* values <0.05 were
434 considered significant.

435

436 **Ethical Considerations**

437 This study is being carried out according to resolution 466/12 CNS, respecting the ethical
438 precepts of the participants. This study is part of a major project called "Development of
439 molecular methods for microorganisms diagnosis and genes involved in bacterial resistance",
440 coordinated by Jane Dagmar Pollo Renner, PhD, approved by the CEP / UNISC, under opinion
441 of: 1,540,110 / 2016 and CAAE: 55494716.3.0000.5343.

442 **Conflicts of Interest**

443 *The authors declare no conflict of interest.*

444 **Acknowledgments**

445 We thank Dionéia Evangelista Cezar from Department of Ecology and Molecular Biology of
446 Microorganisms, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora for the
447 FISH probes and for Centro de Treinamento e Pesquisa em Biotecnologia (CPTBio/UNISC)
448 where almost all experiments were performed. This study was supported in part by a major
449 Project called “Development of molecular methods for microorganisms diagnosis and genes
450 involved in bacterial resistance”, coordinated by Jane Dagmar Pollo Renner, PhD., from
451 UNISC.

452

453 **References**

454 ADÉKAMBI, T. et al. Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba*
455 polyphaga. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 72, n. 9, p. 5974–5981, 2006.

456 AICHELBURG, A. C. et al. Successful Treatment of Disseminated *Acanthamoeba*
457 sp. Infection with Miltefosine. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 1743–
458 1746, 2008. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/11/07-0854_article.htm>

459 AMANN, R. I.; KRUMHOLZ, L.; STAHL, D. A. Fluorescent-oligonucleotide
460 probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in
461 microbiology. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 172, n. 2, p. 762–770, 1990.

462 ASTORGA, B. et al. *Acanthamoeba* belonging to T3, T4, and T11: Genotypes
463 isolated from air-conditioning units in Santiago, Chile. **Journal of Eukaryotic Microbiology**,
464 [s. l.], v. 58, n. 6, p. 542–544, 2011.

465 BAIG, A. M. Primary Amoebic Meningoencephalitis: Neurochemotaxis and
466 Neurotropic Preferences of *Naegleria fowleri*. **ACS Chemical Neuroscience**, [s. l.], v. 7, n. 8,
467 p. 1026–1029, 2016. Disponível em:
468 <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscemneuro.6b00197>>

469 BALCZUN, C.; SCHEID, P. L. Free-living amoebae as hosts for and vectors of

470 intracellular microorganisms with public health significance. **Viruses**, [s. l.], v. 9, n. 4, 2017.

471 BARETE, S. et al. Fatal Disseminated Acanthamoeba lenticulata Acanthamebiasis
472 in a Heart Transplant Patient. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 736–738,
473 2007. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/5/06-1347_article.htm>

474 BEN HAJ KHALIFA, A. et al. [Virulence factors in Pseudomonas aeruginosa:
475 mechanisms and modes of regulation]. **Annales de biologie clinique**, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 393–
476 403, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21896403>>

477 BOOTON, G. C. et al. Molecular and Physiological Evaluation of Subtropical
478 Environmental Isolates of Acanthamoeba spp., Causal Agent of Acanthamoeba Keratitis. **The**
479 **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 192–200, 2004. Disponível em:
480 <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1550-7408.2004.tb00545.x>>

481 BOOTON, G. C. et al. Identification and distribution of Acanthamoeba species
482 genotypes associated with nonkeratitis infections. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v.
483 43, n. 4, p. 1689–1693, 2005.

484 BOOTON, G. C. et al. Genotypic Identification of Acanthamoeba sp. Isolates
485 Associated With an Outbreak of Acanthamoeba Keratitis. **Cornea**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 673–
486 676, 2009. Disponível em:
487 <[http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003226-](http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003226-200907000-00010)
488 [200907000-00010](http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003226-200907000-00010)>

489 BOTTARI, B. et al. Application of FISH technology for microbiological analysis:
490 Current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 73, n. 3, p.
491 485–494, 2006.

492 BRADBURY, R. S.; FRENCH, L. P.; BLIZZARD, L. Prevalence of
493 Acanthamoeba spp. in Tasmanian intensive care clinical specimens. **The Journal of hospital**
494 **infection**, School of Medicine, University of Tasmania, Medical Sciences Building, Liverpool

495 Street, Hobart, Tasmania, Australia; School of Medical and Applied Sciences, Central
496 Queensland University, Bruce Highway, North Rockhampton, Queensland, Australia.
497 *Electroni*, England, v. 86, v. 2014/02/18, n. 3, p. 178–181, 2014.

498 **BRASIL. Resolução RE nº 9, de 16 de janeiro de 2003***Diário Oficial da União,*
499 **Poder Executivo.** [s.l: s.n.]. Disponível em:
500 <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d094d3004e5f8dee981ddcd762e8a5ec/Resoluc
501 ao_RE_n_09.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d094d3004e5f8dee981ddcd762e8a5ec/Resoluc
501 ao_RE_n_09.pdf?MOD=AJPERES)>.

502 **BRASIL. Lei nº 13.589, de 4 de janeiro de 2018.** [s.l: s.n.].

503 BRUGGEMANN, H. et al. Virulence strategies for infecting phagocytes deduced
504 from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. **Cellular Microbiology,**
505 [s. l.], v. 8, n. 8, p. 1228–1240, 2006. Disponível em: <[http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-
506 5822.2006.00703.x](http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-
506 5822.2006.00703.x)>

507 CABELLO-VÍLCHEZ, A. M. et al. The isolation of *Balamuthia mandrillaris* from
508 environmental sources from Peru. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 113, n. 7, p. 2509–2513,
509 2014.

510 CARDAS, M.; KHAN, N. A.; ALSAM, S. *Staphylococcus aureus* exhibit
511 similarities in their interactions with *Acanthamoeba* and ThP1 macrophage-like cells.
512 **Experimental Parasitology**, United States, v. 132, n. 4, p. 513–518, 2012. Disponível em:
513 <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001448941200255X>>

514 CARLESSO, A. M. et al. Isolamento e identificação de amebas de vida livre
515 potencialmente patogênicas em amostras de ambientes de hospital público da Cidade de Porto
516 Alegre, RS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 316–
517 320, 2007.

518 CARLESSO, A. M. et al. Potentially pathogenic *acanthamoeba* isolated from a
519 hospital in Brazil. **Curr Microbiol**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento

520 Leite, 500, Porto Alegre, RS, CEP 90050170, Brazil. anacarlesso@yahoo.com.br, v. 60, v.
521 2009/10/21, p. 185–190, 2010. a.

522 CARLESSO, A. M. et al. Potentially Pathogenic Acanthamoeba Isolated from a
523 Hospital in Brazil. **Current Microbiology**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua
524 Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, RS, CEP 90050170, Brazil. anacarlesso@yahoo.com.br,
525 United States, v. 60, v. 2009/10/21, n. 3, p. 185–190, 2010. b. Disponível em:
526 <<http://link.springer.com/10.1007/s00284-009-9523-7>>

527 CASTRILLÓN, J.; OROZCO, L. Acanthamoeba spp. como parásitos patógenos y
528 oportunistas. **Revista Chilena Infectología**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 147–155, 2013.

529 CAUMO, K.; ROTT, M. B. Acta Tropica Acanthamoeba T3 , T4 and T5 in
530 swimming-pool waters from Southern Brazil. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 117, n. 3, p. 233–235,
531 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.12.008>>

532 CERMEÑO, J. R. et al. Meningoencephalitis by Naegleria fowleri.
533 Epidemiological study in Anzoategui State, Venezuela. **Revista da Sociedade Brasileira de**
534 **Medicina Tropical**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 264–268, 2006.

535 CHAN, L. L. et al. Isolation and characterization of Acanthamoeba spp. from air-
536 conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 117, n. 1, p. 23–30, 2011.
537 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.09.004>>

538 COPE, J. R. et al. Primary Amebic Meningoencephalitis Associated With Rafting
539 on an Artificial Whitewater River: Case Report and Environmental Investigation. **Clinical**
540 **Infectious Diseases**, United States, v. 66, n. 4, p. 548–553, 2018. Disponível em:
541 <<https://academic.oup.com/cid/article/66/4/548/4161734>>

542 CORSARO, D. et al. Molecular identification of bacterial endosymbionts of
543 Sappinia strains. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 116, n. 2, p. 549–558, 2016. Disponível em:
544 <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-016-5319-4>>

545 CORSARO, D.; VENDITTI, D. Nuclear Group I introns with homing endonuclease
546 genes in *Acanthamoeba* genotype T4. **European Journal of Protistology**, [s. l.], v. 66, p. 26–
547 35, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0932473918300610>>

548 COSTA, A. O. et al. Characterization of *acanthamoeba* isolates from dust of a
549 public hospital in Curitiba, Parana, Brazil. **J Eukaryot Microbiol**, Departamento de Patologia
550 Basica, Sector de Ciencias Biologicas, Universidade Federal do Parana, Curitiba, Parana,
551 81531-990, Brazil. adrincosta@ufpr.br, v. 57, v. 2009/12/18, p. 70–75, 2010. a.

552 COSTA, A. O. et al. Characterization of *acanthamoeba* isolates from dust of a
553 public hospital in Curitiba, Paraná, Brazil. **The Journal of eukaryotic microbiology**,
554 Departamento de Patologia Basica, Sector de Ciencias Biologicas, Universidade Federal do
555 Parana, Curitiba, Parana, 81531-990, Brazil. adrincosta@ufpr.br, v. 57, v. 2009/12/18, n. 1, p.
556 70–5, 2010. b. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1550-7408.2009.00453.x>>

557 COTTRELL, M. T.; KIRCHMAN, D. L. Community composition of marine
558 bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ
559 hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 12, p. 5116–5122,
560 2000.

561 CROZETTA, M. A. de S. **Identificação morfológica e molecular de amebas de**
562 **vida livre do gênero *Acanthamoeba* isoladas em poeira de ambiente hospitalar.** 2007.
563 Universidade Federal do Paraná, [s. l.], 2007. Disponível em:
564 <<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/15728>>

565 CURSONS, R. T. M.; BROWN, T. J.; KEYS, E. A. Effect of disinfectants on
566 pathogenic free-living amoebae: In axenic conditions. **Applied and Environmental**
567 **Microbiology**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 62–66, 1980.

568 DA SILVA, M. A.; DA ROSA, J. A. Isolation of potentially pathogenic free-living
569 amoebas in hospital dust. **Revista de saude publica**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 242–6, 2003. a.

570 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12700848>>

571 DA SILVA, M. A.; DA ROSA, J. A. Isolation of potentially pathogenic free-living
572 amoebas in hospital dust. **Revista de saude publica**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 242–6, 2003. b.

573 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12700848>>

574 DART, J. K. G.; SAW, V. P. J.; KILVINGTON, S. Acanthamoeba keratitis:
575 diagnosis and treatment update 2009. **American journal of ophthalmology**, United States, v.
576 148, n. 4, p. 487–499.e2, 2009.

577 DE CARLI, G. A. **Parasitologia Clínica - Seleção de Métodos e Técnicas de**
578 **Laboratório para Diagnóstico das Parasitoses Humanas**. Rio de Janeiro.

579 DELAFONT, V. et al. Environmental factors shaping cultured free-living amoebae
580 and their associated bacterial community within drinking water network. **Water Research**, [s.
581 l.], v. 100, p. 382–392, 2016. Disponível em:
582 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135416303694>>

583 DENDANA, F. et al. Acanthamoeba T4 genotype associated with keratitis
584 infections in Tunisia. **Parasitology research**, Germany, v. 112, n. 1, p. 401–405, 2013.

585 DENONCOURT, A. M.; PAQUET, V. E.; CHARETTE, S. J. Potential role of
586 bacteria packaging by protozoa in the persistence and transmission of pathogenic bacteria.
587 **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 5, n. MAY, p. 1–11, 2014. Disponível em:
588 <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00240/abstract>>

589 DUARTE, J. L. et al. Morphological, genotypic, and physiological characterization
590 of Acanthamoeba isolates from keratitis patients and the domestic environment in Vitoria,
591 Espírito Santo, Brazil. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 135, n. 1, p. 9–14, 2013.
592 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.05.013>>

593 EDAGAWA, A. et al. Isolation and genotyping of potentially pathogenic
594 Acanthamoeba and Naegleria species from tap-water sources in Osaka, Japan. **Parasitology**

595 **Research**, [s. l.], v. 105, n. 4, p. 1109–1117, 2009.

596 EDDYANI, M. et al. Occurrence of Free-Living Amoebae in Communities of Low
597 and High Endemicity for Buruli Ulcer in Southern Benin □. [s. l.], v. 74, n. 21, p. 6547–6553,
598 2008.

599 ETCHEBEHERE, A.; SERVILIERI, K.M.; REGAZZI, R.D.; PEDROSO, M.Z.;
600 SARTORELLI, E.M.; CARLOS, A.L.; NABESHIMA, M.A.; CARDOSO, M.M.; NUNES, N.
601 R. . D. T. A metrologia participa do controle de infecções hospitalares cuidando da qualidade
602 do Ar. **METROSAÚDE- Simpósio de Metrologia na área da Saúde**, [s. l.], p. 1–6, 2005.

603 EVSTIGNEEVA, A. et al. Amoeba co-culture of soil specimens recovered 33
604 different bacteria, including four new species and Streptococcus pneumoniae. **Microbiology**,
605 England, v. 155, n. 2, p. 657–664, 2009. Disponível em:
606 <<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.022970-0>>

607 F SANGER, S. N. and A. C. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
608 **Proc Natl Acad Sci**, [s. l.], v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

609 FOUQUE, E. et al. Experimental Parasitology Encystment of Vermamoeba
610 (Hartmannella) vermiformis: Effects of environmental conditions and cell concentration.
611 **EXPERIMENTAL PARASITOLOGY**, [s. l.], v. 33, p. 1–7, 2014. Disponível em:
612 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.03.029>>

613 GARCIA, A. et al. Identification of Free-Living Amoebae and Amoeba-Associated
614 Bacteria from Reservoirs and Water Treatment Plants by Molecular Techniques.
615 **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 47, n. 7, p. 3132–3140, 2013. Disponível em:
616 <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/es400160k>>

617 GEISEN, S. et al. Acanthamoeba everywhere: high diversity of Acanthamoeba in
618 soils. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 113, n. 9, p. 3151–3158, 2014. Disponível em:
619 <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-014-3976-8>>

620 GRACE, E.; ASBILL, S.; VIRGA, K. Naegleria fowleri: Pathogenesis, Diagnosis,
621 and Treatment Options. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 59, n. 11, p.
622 6677–6681, 2015. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01293-15>>

623 GREUB, G.; RAOULT, D. Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae.
624 **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 413–433, 2004. Disponível em:
625 <<http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.17.2.413-433.2004>>

626 HOGARDT, M. et al. Specific and rapid detection by fluorescent in situ
627 hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. **Journal of**
628 **Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 818–825, 2000.

629 IOVIENO, A. et al. Detection of Bacterial Endosymbionts in Clinical
630 Acanthamoeba Isolates. **Ophthalmology**, [s. l.], v. 117, n. 3, p. 445–452.e3, 2010. Disponível
631 em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161642009009580>>

632 JAHN, C. et al. Caracterização dos Genes de metalo-beta-lactamase blaNDM,
633 blaSPM e blaIMP em Pseudomonas aeruginosa Resistentes a Carbapenems. **Revista de**
634 **Epidemiologia e Controle de Infecção**, [s. l.], v. 6, p. 165–177, 2017. Disponível em:
635 <<https://online.unisc.br/seer/index.php/epidemiologia/article/view/8292>>

636 JAROLIM, K. L. et al. A light microscopy study of the migration of Naegleria
637 fowleri from the nasal submucosa to the central nervous system during the early stage of
638 primary amebic meningoencephalitis in mice. **The Journal of parasitology**, [s. l.], v. 86, n. 1,
639 p. 50–5, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10701563>>

640 KAO, P. et al. Diversity and Seasonal Impact of Acanthamoeba Species in a
641 Subtropical Rivershed. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2013, p. 1–8, 2013.
642 Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/405794/>>

643 KAO, P. et al. Acta Tropica Identification and quantification of the Acanthamoeba
644 species and genotypes from reservoirs in Taiwan by molecular techniques. **Acta Tropica**, [s.

645 l.], v. 132, p. 45–50, 2014. Disponível em:
646 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.12.020>>

647 KARGER, A. E. Separation of DNA sequencing fragments using an automated
648 capillary electrophoresis instrument. **Electrophoresis**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 144–151, 1996.
649 Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/elps.1150170124>>

650 KEBBI-BEGHDADI, C.; GREUB, G. Importance of amoebae as a tool to isolate
651 amoeba-resisting microorganisms and for their ecology and evolution: The Chlamydia
652 paradigm. **Environmental Microbiology Reports**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 309–324, 2014.

653 KHAN, N. A. Acanthamoeba : biology and increasing importance in human health.
654 **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 564–595, 2006. Disponível em:
655 <<https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x>>

656 KHAN, N. A.; JARROLL, E. L.; PAGET, T. A. Acanthamoeba can be
657 differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. **Current**
658 **Microbiology**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 204–208, 2001.

659 KHAN, N.; SIDDIQUI, R. Balamuthia mandrillaris: Morphology, biology, and
660 virulence. **Tropical Parasitology**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 15, 2015. Disponível em:
661 <<http://www.tropicalparasitology.org/text.asp?2015/5/1/15/149888>>

662 KHURANA, S. et al. Free living amoebae in water sources of critical units in a
663 tertiary care hospital in India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Department of
664 Medical Parasitology, Postgraduate Institute of Medical Education and Research, Chandigarh,
665 India., India, v. 33, v. 2015/06/13, n. 3, p. 343–348, 2015. Disponível em:
666 <<http://www.ijmm.org/text.asp?2015/33/3/343/158543>>

667 KOCAZEYBEK, B. Free living amoebae: Acanthamoeba species pose a great risk
668 for human health. **Indian journal of medical microbiology**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 349–50, 2015.
669 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26068333>>

670 KRUMMENAUER, E. C. et al. Resistência x Resistência. **Revista da AMRIGS**,
671 [s. l.], v. 54, n. 1, p. 122–123, 2010.

672 KUIPER, M. W. et al. Quantitative Detection of the Free-Living Amoeba
673 Hartmannella vermiformis in Surface Water by Using Real-Time PCR. **Applied and**
674 **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 72, n. 9, p. 5750–5756, 2006. Disponível em:
675 <<http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.00085-06>>

676 LASJERDI, Z. et al. Potentially pathogenic free-living amoebae isolated from
677 hospital wards with immunodeficient patients in Tehran, Iran. **Parasitology Research**,
678 Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Shahid Beheshti
679 University of Medical Sciences, Tehran, Iran., Germany, v. 109, v. 2011/03/03, n. 3, p. 575–
680 580, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-011-2288-5>>

681 LASJERDI, Z. et al. Ophthalmology hospital wards contamination to pathogenic
682 free living Amoebae in Iran. **Acta Parasitologica**, Poland, v. 60, v. 2015/07/24, n. 3, p. 417–
683 422, 2015. Disponível em: <[https://www.degruyter.com/view/j/ap.2015.60.issue-3/ap-2015-](https://www.degruyter.com/view/j/ap.2015.60.issue-3/ap-2015-0057/ap-2015-0057.xml)
684 0057/ap-2015-0057.xml>

685 LEDEE, D. R. et al. Molecular Identification of T4 and T5 Genotypes in Isolates
686 from Acanthamoeba Keratitis Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 47, n. 5, p.
687 1458–1462, 2009. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.02365-08>>

688 LEUNG, M.; CHAN, A. H. S. Control and management of hospital indoor air
689 quality. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and**
690 **clinical research**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. SR17-23, 2006. Disponível em:
691 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16501436>>

692 LIANG, S.-Y. et al. Isolation and identification of Acanthamoeba species related to
693 amoebic encephalitis and nonpathogenic free-living amoeba species from the rice field.
694 **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 109, n. 4, p. 1422–1429, 2010. Disponível em:

695 <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2010.04779.x>>

696 LIM, N. et al. Comparison of Polyhexamethylene Biguanide and Chlorhexidine as
697 Monotherapy Agents in the Treatment of. [s. l.], 2008.

698 LORENZO-MORALES, J. et al. Pathogenic Acanthamoeba strains from water
699 sources in Jamaica, West Indies. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, [s. l.], v. 99,
700 n. 8, p. 751–758, 2005. Disponível em:
701 <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/136485905X65215>>

702 LORENZO-MORALES, J.; KHAN, N. A.; WALOCHNIK, J. An update on
703 Acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite**, [s. l.], v. 22, p. 10,
704 2015. Disponível em: <<http://www.parasite-journal.org/10.1051/parasite/2015010>>

705 MAGHSOOD, A. H. Acanthamoeba genotype T4 from the UK and Iran and
706 isolation of the T2 genotype from clinical isolates. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.],
707 v. 54, n. 8, p. 755–759, 2005. Disponível em:
708 <<http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.45970-0>>

709 MAGNET, A. et al. A year long study of the presence of free living amoeba in
710 Spain. **Water Research**, [s. l.], v. 47, n. 19, p. 6966–6972, 2013.

711 MAJID, M. A. A. et al. Pathogenic waterborne free-living amoebae: An update
712 from selected Southeast Asian countries. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 1–17, 2017.

713 MANZ, W. et al. Phylogenetic Oligodeoxynucleotide Probes for the Major
714 Subclasses of Proteobacteria: Problems and Solutions. **Systematic and Applied Microbiology**,
715 [s. l.], v. 15, n. 4, p. 593–600, 1992. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0723-](http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80121-9)
716 2020(11)80121-9>

717 MARCIANO-CABRAL, F. et al. Identification of Naegleria fowleri in Domestic
718 Water Sources by Nested PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 69, n.
719 10, p. 5864–5869, 2003.

720 MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. Acanthamoeba spp. as Agents of
721 Disease in Humans. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 273–307, 2003.
722 Disponível em: <<http://cmr.asm.org/content/16/2/273>>

723 MARTÍN-NAVARRO, C. M. et al. The potential pathogenicity of chlorhexidine-
724 sensitive Acanthamoeba strains isolated from contact lens cases from asymptomatic individuals
725 in Tenerife, Canary Islands, Spain. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 57, n. 11, p.
726 1399–1404, 2008.

727 MASCHIO, V. J.; CORÇÃO, G.; ROTT, M. B. Identification of pseudomonas spp.
728 as amoeba-resistant microorganisms in isolates of acanthamoeba. **Revista do Instituto de**
729 **Medicina Tropical de Sao Paulo**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 81–83, 2015.

730 MICHEL, R.; BURGHARDT, H.; BERGMANN, H. Acanthamoeba, naturally
731 intracellularly infected with Pseudomonas aeruginosa, after their isolation from a
732 microbiologically contaminated drinking water system in a hospital. **Zentralblatt fur Hygiene**
733 **und Umweltmedizin = International journal of hygiene and environmental medicine**,
734 Ernst-Rodenwaldt-Institut, Koblenz., Germany, v. 196, v. 1995/03/01, n. 6, p. 532–44, 1995.
735 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7619202>>

736 MIYAKE, M.; FUKUI, T.; IMAI, Y. Differences in protein synthesis between wild
737 type and intracellular growth-deficient strains of Legionella pneumophila in U937 and
738 Acanthamoeba polyphaga. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 161–170, 2006.
739 Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401006000027>>

740 MIYAMOTO, H. et al. Development of a new seminested PCR method for
741 detection of Legionella species and its application to surveillance of Legionellae in hospital
742 cooling tower water. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 63, n. 7, p. 2489–
743 2494, 1997.

744 MOTER, A.; GÖBEL, U. B. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct

745 visualization of microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 41, n. 2, p.
746 85–112, 2000. Disponível em:
747 <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701200001524>>

748 MUCHESA, P.; BARNARD, T. G.; BARTIE, C. The prevalence of free-living
749 amoebae in a South African hospital water distribution system. **South African Journal of**
750 **Science**, [s. l.], v. 111, n. 1–2, p. 3–5, 2015. Disponível em:
751 <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84921888151&doi=10.17159%2Fsajs.2015%2F20140278&partnerID=40&md5=b3edaf20e4066c3a1ee51ac86c28da30>>

752
753

754 NAGYOVÁ, V.; NAGY, A.; TIMKO, J. Morphological, physiological and
755 molecular biological characterisation of isolates from first cases of Acanthamoeba keratitis in
756 Slovakia. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 106, n. 4, p. 861–872, 2010. Disponível em:
757 <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-010-1731-3>>

758 NBR7256. Norma Brasileira - Associação Brasileira de Normas Técnicas
759 (ABNT)2005.

760 NEFF, R. J.; NEFF, R. H. The biochemistry of amoebic encystment. **Symposia of**
761 **the Society for Experimental Biology**, [s. l.], v. 23, p. 51–81, 1969. Disponível em:
762 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4243920>>

763 NIYYATI, M. et al. Isolation of Balamuthia mandrillaris from urban dust, free of
764 known infectious involvement. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 106, n. 1, p. 279–281, 2009.
765 Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-009-1592-9>>

766 NIYYATI, M. et al. Occurrence of Free-living Amoebae in Nasal Swabs of Patients
767 of Intensive Care Unit (ICU) and Critical Care Unit (CCU) and Their Surrounding
768 Environments. **Iranian journal of public health**, Iran, v. 47, n. 6, p. 908–913, 2018.

769 NIYYATI, M.; REZAEIAN, M. Current status of Acanthamoeba in Iran: A

770 narrative review article. **Iranian Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 157–163, 2015.

771 ODDÓ B, D.; CIANI A, S.; VIAL C, P. Encefalitis amebiana granulomatosa por
772 *Balamuthia mandrillaris*: Primer caso diagnosticado en Chile. **Revista chilena de infectología**,
773 [s. l.], v. 23, n. 3, p. 232–236, 2009.

774 OOI, S. S. et al. The correlation of *Acanthamoeba* from the ventilation system with
775 other environmental parameters in commercial buildings as possible indicator for indoor air
776 quality. **INDUSTRIAL HEALTH****Industrial Health**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 35–45, 2016.

777 OVRUTSKY, A. R. et al. Cooccurrence of Free-Living Amoebae and
778 Nontuberculous Mycobacteria in Hospital Water Networks, and Preferential Growth of
779 *Mycobacterium avium* in *Acanthamoeba lenticulata*. **Applied and Environmental**
780 **Microbiology**, National Jewish Health, Denver, CO, USA., United States, v. 79, v. 2013/03/12,
781 n. 10, p. 3185–3192, 2013. Disponible em:
782 <<http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.03823-12>>

783 PAGE, F. C. **A new key to freshwater and soil gymnamoebae : with instructions**
784 **for culture**. Cumbria, UK: Freshwater Biological Association Scientific Publications, 1988.

785 PANDA, A. et al. Prevalence of *naegleria fowleri* in environmental samples from
786 northern part of India. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 1–14, 2015.

787 PÉLANDAKIS, M.; SERRE, S.; PERNIN, P. Analysis of the 5.8S rRNA gene and
788 the internal transcribed spacers in *Naegleria* spp. and in *N. fowleri*. **Journal of Eukaryotic**
789 **Microbiology**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 116–121, 2000.

790 PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-
791 Negative Bacteria. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 362, n. 19, p. 1804–1813,
792 2010. Disponible em:
793 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463340><http://www.pubmedcentral.nih.gov/arti>
794 [clerender.fcgi?artid=PMC3107499](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3107499)>

795 PUSSARD, R. PONS, R. M.-P. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du
796 genre *Acanthamoeba* (Protozoa: Amoebida). **Protistologica**, [s. l.], v. 13, p. 557–598, 1977.

797 QVARNSTROM, Y. et al. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous
798 detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. **Journal of**
799 **Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 44, n. 10, p. 3589–3595, 2006.

800 RAHDAR, M. et al. Isolation and genotyping of *acanthamoeba* strains from
801 environmental sources in ahvaz city, khuzestan province, southern iran. **Iranian journal of**
802 **parasitology**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 22–6, 2012. Disponível em:
803 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23323088>>

804 RENNER, J. D. P.; CARVALHO, É. D. MICRORGANISMOS ISOLADOS DE
805 SUPERFÍCIES DA UTI ADULTA EM UM HOSPITAL DO VALE DO RIO PARDO – RS.
806 **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 40, 2013. Disponível
807 em: <<http://online.unisc.br/seer/index.php/epidemiologia/article/view/3290>>

808 RETANA-MOREIRA, L. et al. Isolation and molecular characterization of
809 *Acanthamoeba* and *Balamuthia mandrillaris* from combination shower units in Costa Rica.
810 **Parasitology Research**, [s. l.], v. 113, n. 11, p. 4117–4122, 2014.

811 REYES-BATLLE, M. et al. *Acanthamoeba* genotypes T2 , T4 , and T11 in soil
812 sources from El Hierro island , Canary Islands , Spain. **Parasitology Research**, [s. l.], p. 3–6,
813 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5048-8>>

814 RIVIÈRE, D. et al. Development of a real-time PCR assay for quantification of
815 *Acanthamoeba* trophozoites and cysts. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 64, n.
816 1, p. 78–83, 2006.

817 ROHR, U. et al. Comparison of free-living amoebae in hot water systems of
818 hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining
819 temperature tolerance. **Applied and environmental microbiology**, Institut fur Hygiene und

820 Mikrobiologie, Ruhr-Universität Bochum, Germany. rohr@hygiene.ruhr-uni-bochum.de,
821 United States, v. 64, v. 1998/05/09, n. 5, p. 1822–1824, 1998. Disponível em:
822 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9572957>>

823 SCHEIKL, U. et al. Free-living amoebae and their associated bacteria in Austrian
824 cooling towers: a 1-year routine screening. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 115, n. 9, p. 3365–
825 3374, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5097-z>>

826 SCHMITZ-ESSER, S. et al. Diversity of bacterial endosymbionts of environmental
827 Acanthamoeba isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 74, n. 18, p.
828 5822–5831, 2008.

829 SCHROEDER, J. M. et al. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and
830 sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis
831 and from sewage sludge. **Journal of clinical microbiology**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 1903–11, 2001.
832 Disponível em: <<https://insights.ovid.com/crossref?an=00003081-198703000-00012>>

833 SCHUNDER, E. et al. Phospholipase PlaB is a new virulence factor of Legionella
834 pneumophila. **International Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 300, n. 5, p. 313–
835 323, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.01.002>>

836 SENTE, C. et al. Prevalence of pathogenic free-living amoeba and other protozoa
837 in natural and communal piped tap water from Queen Elizabeth protected area , Uganda.
838 **Infectious Diseases of Poverty**, [s. l.], p. 1–14, 2016. Disponível em:
839 <<http://dx.doi.org/10.1186/s40249-016-0162-5>>

840 SIDDIQUI, R.; DUDLEY, R.; KHAN, N. A. Acanthamoeba differentiation: A two-
841 faced drama of Dr Jekyll and Mr Hyde. **Parasitology**, [s. l.], v. 139, n. 7, p. 826–834, 2012.

842 SIDDIQUI, R.; JARROLL, E. L.; KHAN, N. A. Balamuthia mandrillaris: Role of
843 galactose in encystment and identification of potential inhibitory targets. **Experimental**
844 **Parasitology**, [s. l.], v. 126, n. 1, p. 22–27, 2010. Disponível em:

845 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.09.013>>

846 SIDDIQI, R.; KHAN, N. A. Photochemotherapeutic strategies against
847 Acanthamoeba keratitis. **AMB Express**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 1, 2012. Disponível em: <AMB
848 Express>

849 SIDDIQI, R.; KHAN, N. A. Primary Amoebic Meningoencephalitis Caused by
850 Naegleria fowleri: An Old Enemy Presenting New Challenges. **PLoS Neglected Tropical**
851 **Diseases**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. e3017, 2014. Disponível em:
852 <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003017>>

853 SPANAKOS, G. et al. Genotyping of pathogenic Acanthamoebae isolated from
854 clinical samples in Greece-Report of a clinical isolate presenting T5 genotype. **Parasitology**
855 **International**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 147–149, 2006.

856 SPILKER, T. et al. PCR-based assay for differentiation of Pseudomonas aeruginosa
857 from other Pseudomonas species recovered from cystic fibrosis patients. **Journal of clinical**
858 **microbiology**, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 2074–9, 2004. Disponível em:
859 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15131172>>

860 STOTHARD, D. R. et al. The evolutionary history of the genus Acanthamoeba and
861 the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. **Journal of Eukaryotic**
862 **Microbiology**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 45–54, 1998.

863 TASHIRO, Y.; UCHIYAMA, H.; NOMURA, N. Multifunctional membrane
864 vesicles in Pseudomonas aeruginosa. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 1349–
865 1362, 2012.

866 TEIXEIRA, L. H. et al. Prevalence of potentially pathogenic free-living amoebae
867 from Acanthamoeba and Naegleria genera in non-hospital, public, internal environments from
868 the city of Santos, Brazil. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official**
869 **publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, Catholic University of Santos,

870 Santos, SP, Brazil., Brazil, v. 13, v. 2010/05/14, n. 6, p. 395–397, 2009. Disponível em:
871 <[https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-
872 77953936798&partnerID=40&md5=3d8740461f2950cf047b739e919f077b](https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-77953936798&partnerID=40&md5=3d8740461f2950cf047b739e919f077b)>

873 THOMAS, V. et al. Biodiversity of Amoebae and Amoeba-Resisting Bacteria in a
874 Hospital Water Network. **Applied and environmental microbiology**, United States, v. 72, n.
875 4, p. 2428–2438, 2006. Disponível em: <[http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.72.4.2428-
876 2438.2006](http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.72.4.2428-2438.2006)>

877 THOMAS, V. et al. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic
878 microorganisms: risks for water quality. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 34, n. 3, p.
879 231–259, 2010. Disponível em: <[https://academic.oup.com/femsre/article-
880 lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2009.00190.x](https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2009.00190.x)>

881 TODD, C. D. et al. Isolation and Genotyping of Acanthamoeba Strains from Soil
882 Sources from Jamaica, West Indies. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s. l.], v. 62, n. 3,
883 p. 416–421, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jeu.12197>>

884 TRABELSI, H. et al. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical
885 review. **Pathologie Biologie**, [s. l.], v. 60, n. 6, p. 399–405, 2012. Disponível em:
886 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.patbio.2012.03.002>>

887 TRABELSI, H. et al. Morphological and molecular identification of free living
888 amoeba isolated from hospital water in Tunisia. **Parasitology Research**, Fungal and parasitic
889 molecular biology laboratory- Sfax, School of Medicine, Sfax University, 3029, Sfax, Tunisie.
890 Thouaida@yahoo.fr. Fungal and parasitic molecular biology laboratory- Sfax, School of
891 Medicine, Sfax University, 3029, Sfax, Tunisie., Germany, v. 115, v. 2015/10/16, n. 1, p. 431–
892 435, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-015-4788-1>>

893 TRABELSI, H. et al. Morphological and molecular identification of free living
894 amoeba isolated from hospital water in Tunisia. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 115, n. 1, p.

895 431–435, 2016. Disponible em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-015-4788-1>>

896 VILLAJOS, J.R.O.; SIMÓ, B. Notas sobre la ecología de Legionella: “El caballo
897 de Troya”. **Profesión Veterinaria**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 54–59, 2008. Disponible em:
898 <<http://europa.sim.ucm.es/compludoc/AA?articuloId=617880>>

899 VISVESVARA, G. S. et al. Paravahlkampfia francinae n. sp. Masquerading as an
900 Agent of Primary Amoebic Meningoencephalitis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s.
901 l.], v. 56, n. 4, p. 357–366, 2009. Disponible em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1550->
902 7408.2009.00410.x>

903 VISVESVARA, G. S. Infections with free-living amoebae. In: **Handbook of clinical**
904 **neurology**. [s.l.] : Elsevier, 2013. p. 153–168.

905 VISVESVARA, G. S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F. L. Pathogenic and
906 opportunistic free-living amoebae: Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris , Naegleria
907 fowleri , and Sappinia diploidea. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, [s. l.], v. 50,
908 n. 1, p. 1–26, 2007. a. Disponible em: <<https://academic.oup.com/femspd/article->
909 [lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x](https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x)>

910 VISVESVARA, G. S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F. L. Pathogenic and
911 opportunistic free-living amoebae: Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris , Naegleria
912 fowleri , and Sappinia diploidea. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, [s. l.], v.
913 50, n. 1, p. 1–26, 2007. b. Disponible em: <<https://academic.oup.com/femspd/article->
914 [lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x](https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x)>

915 WALIA, R. et al. A case of successful treatment of cutaneous Acanthamoeba
916 infection in a lung transplant recipient. **Transplant Infectious Disease**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 51–
917 54, 2007.

918 WALOCHNIK, J.; SCHEIKL, U.; HALLER-SCHÖBER, E.-M. Twenty Years of
919 Acanthamoeba Diagnostics in Austria. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s. l.], v. 62, n.

920 1, p. 3–11, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jeu.12149>>

921 WALOCHNIK, J.; WYLEZICH, C.; MICHEL, R. The genus Sappinia: History,
922 phylogeny and medical relevance. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 126, n. 1, p. 4–13,
923 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.11.017>>

924 WATSON, P. M.; SORRELL, S. C.; BROWN, M. W. Ptolemeba n. gen., a Novel
925 Genus of Hartmannellid Amoebae (Tubulinea, Amoebozoa); with an Emphasis on the
926 Taxonomy of Saccamoeba. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s. l.], v. 61, n. 6, p. 611–
927 619, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jeu.12139>>

928 ZHANG, Y. et al. Identification of 18S Ribosomal DNA Genotype of
929 Acanthamoeba from Patients with Keratitis in North China. **Investigative Ophthalmology &**
930 **Visual Science**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 1904, 2004. Disponível em:
931 <<http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.03-1073>>

932

Table and Figure Legends

Table 1. Frequency of FLA isolation from dust samples collected in the different hospital sites studied.

Table 2. Mean cysts sizes and shapes of the isolates cysts.

Table 3. Distribution of potentially pathogenic isolates of *Acanthamoeba* spp. by hospital isolation site.

Table 4. Distribution of *Acanthamoeba* species by hospital isolation site.

Table 5. Distribution of *Acanthamoeba* species and their genotypes by hospital isolation site.

Table 6. Frequency comparison of *Pseudomonas* spp. isolation from FLA samples collected in different hospital sites.

Table 7. Detailed description of genus-specific oligonucleotides and PCRs conditions.

Table 8. Oligonucleotide probes marked with Cy3 fluorochrome used for microorganisms identification by FISH method.

Figure 1. (a) FLA; (b) Filamentous fungi in 40X objective; (c) FLA subculture free of fungal contamination, 40X objective.

Figure 2. *Acanthamoeba* spp. trophozoites with acanthopodia and contractile vacuoles examined by optical microscopy (40X objective).

Figure 3. (a) DAPI-stained amoeba observed in epifluorescence microscopy; (b) Amoeba Cy3 stained, positive for *Pseudomonas aeruginosa* probe.

Tables

Table 1.

<i>Site</i>	<i>N° samples collected</i>	<i>Positive for FLA</i>	<i>%</i>	<i>p Value</i>
AICU	40	29	72.5	<0.001
KIT	60	51	85	
OCS	32	23	71.9	
OR	52	25	48	
PICU	50	42	84	
Total	234	170	-	

AICU: Adult Intensive Care Unit; KIT: Kitchen; OCS: Outpatient Care Sector; OR: Operating Room; PICU: Pediatric Intensive Care Unit.

Table 2.

<i>Shape</i>	<i>Endocyst</i>				<i>Ectocyst</i>				
	<i>N (%)</i>	<i>Size</i>	<i>SD</i>	<i>p</i>	<i>Shape</i>	<i>N (%)</i>	<i>Size</i>	<i>SD</i>	<i>p</i>
Stellate	25 (15)	12.7	0.97	0.78	Smooth	69 (40)	12.75	0.94	0.46
Polyhedral	126 (74)	12.72	1.04		Wavy	101 (60)	12.73	1.09	
Triangular	19 (11)	12.89	1.09						

N: sample number; SD: standard deviation.

Table 3.

<i>Site</i>	<i>Non- pathogenic (%)</i>	<i>Low pathogenic potential (%)</i>	<i>Potentially pathogenic (%)</i>	<i>p Value</i>
AICU	02 (6.9)	06 (20.7)	21 (72.4)	0.35
KIT	02 (4)	15 (29.4)	34 (66.6)	
OCS	0	08 (34.8)	15 (65.2)	
OR	0	03 (12)	22 (88)	
PICU	04 (9.5)	08 (19)	30 (71.5)	
Total	08	40	122	

AICU: Adult Intensive Care Unit; KIT: Kitchen; OCS: Outpatient Care Sector; OR: Operating Room; PICU: Pediatric Intensive Care Unit.

Table 4.

Site	<i>Acanthamoeba</i> spp.	<i>A. castellanii</i>	<i>A. culbertsoni</i>	<i>A. polyphaga</i>
AICU	29	21	7	1
KIT	51	33	9	9
OCS	23	17	4	2
OR	25	20	0	5
PICU	42	33	3	6
Total	170	124	23	23
%	100	72.9	13.5	13.5

AICU: Adult Intensive Care Unit; KIT: Kitchen; OCS: Outpatient Care Sector; OR: Operating Room; PICU: Pediatric Intensive Care Unit.

Table 5.

Site	<i>Acanthamoeba</i> spp. by site	<i>Acanthamoeba</i> specie by site	Specie name	GenBank	Genotypes	T4 (N)	T4 (%)
AICU	29	21	<i>A. castellanii</i>		T4	22	75.9
		7	<i>A. culbertsoni</i>		T3		
		1	<i>A. polyphaga</i>		T4		
KIT	51	33	<i>A. castellanii</i>		T4	33	64.7
		9	<i>A. culbertsoni</i>		T3		
		8	<i>A. polyphaga</i>		T5		
		1		T11			
OCS	23	17	<i>A. castellanii</i>		T4	18	78.3
		4	<i>A. culbertsoni</i>		T3		
		1	<i>A. polyphaga</i>		T4		
		1		T5			
OR	25	18	<i>A. castellanii</i>		T4	18	72.0
		2		T5			
		5	<i>A. polyphaga</i>		T5		
PICU	42	31	<i>A. castellanii</i>		T4	32	76.2
		2		T11			
		3	<i>A. culbertsoni</i>		T3		
		1	<i>A. polyphaga</i>		T4		
		5		T5			
Total	170	170				123	72.4

AICU: Adult Intensive Care Unit; KIT: Kitchen; OCS: Outpatient Care Sector; OR: Operating Room; PICU: Pediatric Intensive Care Unit.

Table 6.

<i>Pseudomonas</i> spp. PCR				
<i>Site</i>	<i>N^o samples</i>	<i>Positive</i>	<i>%</i>	<i>p Value</i>
AICU	29	10	34.5	0.061
KIT	51	6	11.8	
OCS	23	6	26	
OR	25	4	16	
PICU	42	14	33.3	
Total	170	40	100	

AICU: Adult Intensive Care Unit; KIT: Kitchen; OCS: Outpatient Care Sector; OR: Operating Room; PICU: Pediatric Intensive Care Unit.

Table 7.

Organism	Genus	Target	Amplicon size (pb)	Primer name	Sequence 5'-3'	Cycling conditions	Reference
Amoeba	<i>Acanthamoeba</i> spp. (identification)	18S rDNA	461	JDP1 JDP2	GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA TCTCACAAGCTGCTAGGGGAGTCA	94°C - 5 min + 35x 94°C - 1 min, 52°C - 1 min, 72°C - 1 min + 72°C - 5 min	Schroeder <i>et al.</i> , 2001; Booton <i>et al.</i> , 2005
	<i>Acanthamoeba</i> spp. (genotyping)					94°C - 1 min + 45x 94°C - 10 sec - 60°C 7 sec + 60°C 3 min	
	<i>Naegleria</i> spp.	ITS Region (5.8 rDNA)	408-457	ITS1 ITS2	GAACCTGCGTAGGGATCATT TTTCTTTTCCTCCCCTTATTA	94°C - 3 min + 30x 94°C - 30 s, 55°C - 30 s, 72°C - 30 s + 72°C - 5 min	Pélandakis <i>et al.</i> , 2000
	<i>Vermamoeba</i> (<i>Hartmanella</i>) spp.	18S rDNA	502	Hv1227F Hv1227R	TTACGAGGTCAGGACACTGT GACCATCCGGAGTTCTCG	94°C - 5 min + 35x 94°C - 1 min, 52°C - 1 min, 72°C - 1 min + 72°C - 5 min	Kuiper <i>et al.</i> , 2006
Endosymbionts	<i>Pseudomonas</i> spp.	16SrDNA	618	PA-GS-F PA-GS-R	GACGGGTGAGTAATGCCTA CACTGGTGTTCCTTCTATA	94°C - 5 min + 35x 94°C - 1 min, 52°C - 1 min, 72°C - 1 min + 72°C - 5 min	Spilker <i>et al.</i> , 2004
	<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>rpoB</i>	723	MycoF MycoR	GGCAAGGTCACCCGAAGGG AGCGGCTGCTGGGTGATCATC	45x 94°C - 1 min, 60°C - 1 min, 72°C - 1 min + 72°C - 10 min	Adékambi <i>et al.</i> , 2006
	<i>Legionella</i> spp.	16SrDNA	654	LEG-225 LEG-858	AAGATTAGCCTGCGTCCGAT GTCAACTTATCGCGTTTGCT	45°C - 10 min + 95°C - 10 min + 30x 95°C - 60 s, 63°C - 90 s	Miyamoto <i>et al.</i> , 1997

Table 8.

<i>Probe</i>	<i>Specificity</i>	<i>Probe sequence</i> 5'-3'	<i>Formamide (%v/v)</i>	<i>Reference</i>
EUB338	<i>Eubacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	30	Amann <i>et al.</i> , 1990
NON	<i>Negative control</i>	CCTAGTGACGCCGTCGAC	30	Cottrell and Kirchman, 2000
ALFA968	<i>Alphaproteobacteria</i>	GGTAAGGTCTGCGCGTT	30	Amann <i>et al.</i> , 1990
BETA42A	<i>Betaproteobacteria</i>	GCCTCCCATTGTTT	30	Manz <i>et al.</i> , 1992
GAMA42A	<i>Gammaproteobacteria</i>	GCCTCCCACATCGTTT	30	Manz <i>et al.</i> , 1992
PseaeA	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	GGTAACCGTCCCCCTTGC	30	Hogardt <i>et al.</i> , 2000

Figures

Figure 1

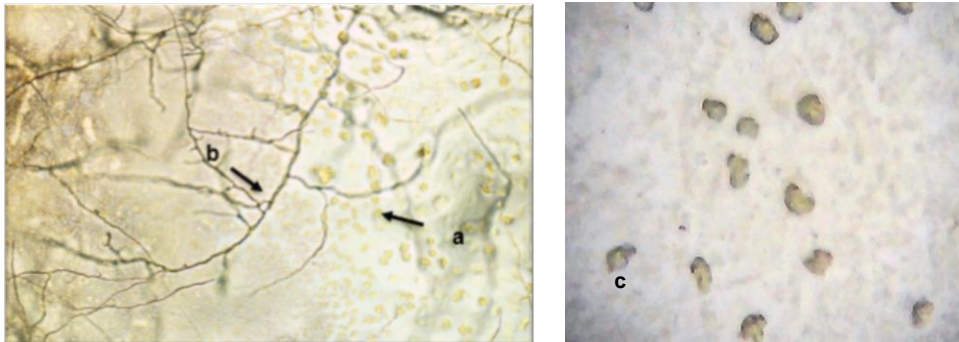


Figure 2

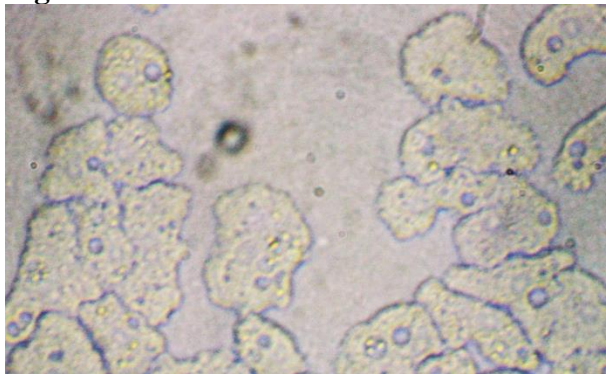
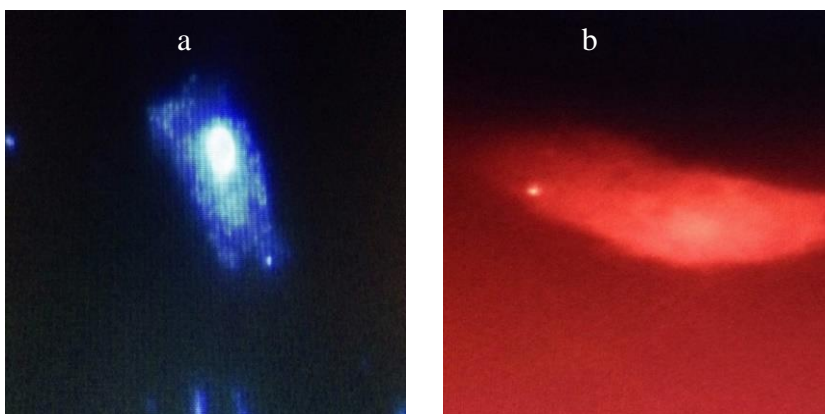
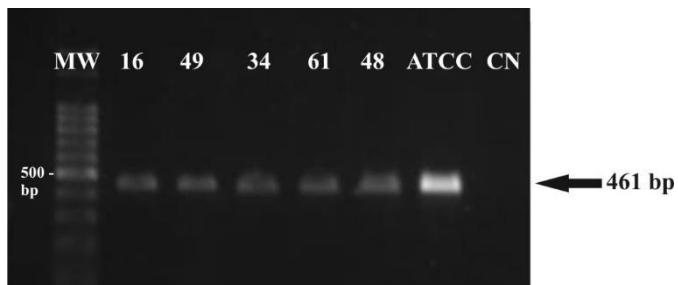


Figure 3.

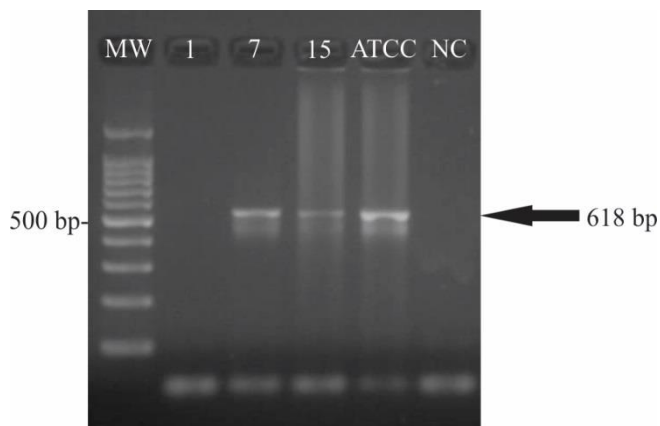


Supplementary material

Supplementary Figure 1. FLA identification by PCR amplification. of 18SrDNA *Acanthamoeba* spp. using primers JDP1 and JDP2.



Supplementary Figure 2. Identification of endosymbionts by PCR amplification: (a) *Pseudomonas* spp., (b) *Mycobacterium* spp. and (c) *Legionella* spp.



6. ARTIGO 2

Artigo que será submetido à Revista Científica Parasitology Research.

REVIEW ARTICLE

Occurrence of *Acantamoeba* in hospitals: a review in the literature

Danielly Joani Bullé^{1,2}; Lisianne Brittes Benitez²; Marilise Brittes Rott³

Affiliations:

¹Doutoranda Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre RS, Brasil.

²Departamento de Biologia e Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, RS, Brazil.

³Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Corresponding author:

Marilise Brittes Rott

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

mariliserott@ufrgs.br

+55 51 37131798

Abstract

Acanthamoeba are among the most prevalent environmental protozoa. They have cosmopolitan distribution. The main concern for public health purposes is that they can also be isolated from contact lenses, storage cases and cleaning solutions, from ventilation and air conditioning system, dental treatment units, dialysis units, emergency showers and eyewash station. These genera. can host a diversity of pathogenic microorganisms that leads to infectious diseases inside the hospital environment, and it is urgent to do them surveillance thinking on the immunocompromised patients that are susceptible. The level of human health risk and these associations in hospital environment is unknown, and part of this problem is potentially the lack of correlation between ameba exposure and the onset of symptoms that each patient can develop different periods in time. Studies on the ecology and distribution of non-enteric pathogens in the hospital environment are necessary to understand their potential threat to human health. Thus, this review represents a current view of the presence of *Acanthamoeba* spp in hospital environments in order to understand their presence in these environments, and to look for effective ways of their control by disinfections and monitoring measures.

Keywords: Potentially pathogenic; opportunistic; free-living amoebae; hospital environment

Introduction

Acanthamoeba are among the most prevalent environmental protozoa. They have cosmopolitan distribution and have already been isolated in the most distinct natural habitats including soil, dust, air and beach sand (Neff 1957; D. and Warhurst 1969; Lorenzo-Morales et al. 2005b; Rezaeian, Niyiyati, Farnia 2008; Niyiyati et al. 2009; Geisen et al. 2014; Ooi et al. 2016). They can also be identified in aquatic environment as sea water, swimming pools, thermal waters, sewage treatment systems (Schroeder et al. 2001; Lorenzo-Morales et al. 2005a; Caumo and Rott 2011; Kao et al. 2012). The main concern for public health purposes is that they can also be isolated from contact lenses, storage cases and cleaning solutions, from ventilation and air conditioning system, dental treatment units, dialysis units , emergency showers and eyewash stations (Bier and Sawyer 1990; el Sibae 1993; Barbeau and Buhler 2001; Rowland 2003; Ager and Tickner 2007; Dendana et al. 2008; Astorga et al. 2011; Chan et al. 2011; Hassan et al. 2012; Castro-Artavia et al. 2017). They were also isolated as contaminants in cell cultures of mammalian, bacterial and yeast cells (Culbertson et al. 1959; Warhurst and Armstrong 1968; Sandstrom et al. 2011).

Over the past several decades, these organisms have gained increasing attention due to their diverse roles in the ecosystem and in particular, their role in causing serious and sometimes fatal human infections (Siddiqui et al. 2012). The first cases which clearly established by *Acanthamoeba* as causative agents of disease in humans were reported in the early 1970s. This genus causes three main types of illness involving the eye (*Acanthamoeba* keratitis), the brain and spinal cord (Granulomatous Encephalitis), and infections that can spread throughout the entire body (disseminated infection). Individuals who develop GAE or disseminated disease are usually immunocompromised, whereas those with keratitis are usually immunocompetent. Disseminated disease and GAE carry a poor prognosis, and treatment strategies are not well defined; *Acanthamoeba* keratitis is a sight-threatening infection that carries a favorable

prognosis when diagnosed and treated early (Marciano-Cabral and Cabral 2003; Haburchak 2017).

Acanthamoeba spp during trophozoites stage, that is the metabolically active stage, feeds on bacteria, fungi and algae by phagocytosis (Greub and Raoult 2004; Trabelsi et al. 2012). Normally during this process, microorganisms such as bacteria and fungi undergo digestion within amoebic phagolysosomes (Kebbi-Beghdadi and Greub 2014). Some have evolved and become resistant to these protozoa, becoming able to survive and in many cases to multiply in the amoebic interior until they are released again by the lysis of this protozoan or by means of vesicles (Greub and Raoult 2004). These microorganisms are called amoeba-resistant microorganisms (ARMs) (Guimaraes et al. 2016). Several bacteria, fungi, protozoa and pathogenic viruses have been described as ARMs (Ovrutsky et al. 2013; Muchesa et al. 2015; Delafont et al. 2016; Fukumoto et al. 2016; Balczun and Scheid 2017).

The presence of *Acanthamoeba* spp. in a hospital environment demonstrates that the disinfection measures used are insufficient to remove these protozoa. Their intrinsic resistance to high-level disinfectants highlight the need to better evaluate and understand the actions of these treatments against these Trojan horses. Therefore, it is necessary to alert health professionals to pay more attention to the disinfection processes used (Barker and Brown 1994; Coulon et al. 2010; Perçin 2016).

If *Acanthamoeba* spp. can host a diversity of pathogenic microorganisms that leads to infectious diseases inside the hospital environment, it is urgent to do them surveillance thinking on the immunocompromised patients that are susceptible. The level of human health risk and these associations in hospital environment is unknown, and part of this problem is potentially the lack of correlation between ameba exposure and the onset of symptoms that each patient can develop different periods in time. Studies on the ecology and distribution of non-enteric pathogens in the hospital environment are necessary to understand their potential threat to

human health. Yet one of the biggest challenges remains effective monitoring. Thus, this review represents a current overview of *Acanthamoeba* spp. in hospital settings and try to provide a direction in how to deal with their presence in these environments.

***Acanthamoeba* spp. Taxonomy and Classification**

In 1930, *Acanthamoeba* was first reported, when Castelani observed the presence of an amoeba in *Cryptococcus pararoseus* cultivation. Until 1959, species of these genera were considered harmless amebas, of free life living in water and soil. Culbertson et al. (1959) Culbertson et al. were the first to demonstrate the *Acanthamoeba* pathogenicity, inducing fatal experimental infections in mice and monkeys. Since 1985, there has been a clear increase in the incidence of the disease. The first report of *Acanthamoeba* as a disease-causing agent in humans was in 1972 (Anzil et al. 1991; Marciano-Cabral and Cabral 2003; Castrillón and Orozco 2013).

In 1977, Pussard and Pons suggested a classification for *Acanthamoeba* spp. The new classification was based on morphological, biochemical and molecular techniques, mainly based on 18S rDNA gene sequencing.

Based on the cysts morphology, the species were divided into three groups. Among the groups, group II is the largest, is widely distributed and commonly isolated among *Acanthamoeba* species, and most of them are pathogenic (Schuster and Visvesvara 2004; Khan 2006; Castrillón and Orozco 2013). Morphological classification based on cysts morphometry was accepted by other authors. In 1988, Page developed the dichotomous key for the identification of free-living amoebae (FLA), including the criteria proposed by Pussard and Pons (1977) and added characteristics of trophozoites, such as the behavior of these forms against different temperatures and type of locomotion (Khan 2006).

Group I has large cysts (16-30 μm), with starry endocyst and more or less spherical ectocysts. Group II has an average size of 18 μm , the endocyst can be star-shaped, oval or

triangular, and the ectocyst follows the same contour of the endocyst, but slightly wrinkled. Amoebas belonging to group III have smaller size until 18 µm, rounded or globular endocyst and slightly wrinkled ectocyst, sometimes is difficult to observe because it is endocyst juxtaposed. The *Acanthamoeba* classification and species distribution as described by Pussard and Pons (1977) can be observed in **Table 1** (Stothard et al. 1998; Khan 2006; Visvesvara et al. 2007; Lorenzo-Morales et al. 2015). Currently the most widely used and accepted classification is based on 18S rDNA gene sequences, which allowed the identification of about 20 genotypes (T1-T20), exhibiting 5% or more divergence with each other. The T4 genotype is associated with the majority of human infections caused by *Acanthamoeba*, and accounts for about 90% of the *Acanthamoeba* keratitis cases. Likewise, T4 is the main genotype associated with infections caused by this protozoan (Siddiqui and Khan 2012; BECKER-FINCO et al. 2013; Corsaro et al. 2015).

Table 1. *Acanthamoeba* classification and species distribution as described by Pussard and Pons (1977).

Group I	Group II	Group III
<i>A. astronyxis</i>	<i>A. castellannii</i>	<i>A. culberlsoni</i>
<i>A. echinulata</i>	<i>A. mauritaniensis</i>	<i>A. pustulosa</i>
<i>A. tubiashi</i>	<i>A. polyphaga</i>	<i>A. palestinensis</i>
<i>A. comandoni</i>	<i>A. lugdunensis</i>	<i>A. royreba</i>
	<i>A. quina</i>	<i>A. lenticulata</i>
	<i>A. triangularis</i>	
	<i>A. rhyodes</i>	
	<i>A. hatchetti</i>	
	<i>A. divionensis</i>	
	<i>A. griffini</i>	

Life Cycle of *Acanthamoeba* spp.

The life cycle of *Acanthamoeba* comprises two stages: the trophozoite and the cyst. The trophozoite is the form of locomotion and active feeding of amoeba, the reproduction of these organisms occurs by binary division. It feeds on bacteria, algae and yeasts from the environment, mainly from soil and water, but also manages to capture nutrients by pinocytosis. The cyst amoeba has the advantage of surviving and resisting unfavorable environmental conditions and trophozoite under favorable feeding and temperature conditions (AKSOZEC et al., 2002). Studies indicate that in this form they can survive in vitro for up to 20 years or more (Mazur et al. 1995). The trophozoite varies in size from 25 to 40 micrometers, has a trilaminar plasma membrane and is characterized by the presence of superficial projections in the form of spikes called acanthopods, a contractile vacuole prominent in the cytoplasm to control the intracellular water content, and a nucleus with large central nucleoli. The cysts vary in size from 10 to 20 micrometers, have a double wall (endo and ectocyst), normally separated by a space, except at certain points where they form opercula in the centre of ostioles (exit points for excysting trophozoite). This occurs only under optimal conditions (food supply, neutral pH, ~30°C) and 50-80mOsmol (Band and Mohrlök 1973; Siddiqui et al. 2012).

Relationship among *Acanthamoeba* spp. and other pathogens

Acanthamoeba can serve as an environmental reservoir and vector for a wide variety of microorganisms as bacterial pathogens, fungi and viruses. Between them, the bacteria are the most documented kind of endosymbiont. There are many bacteria that are resistant to these amoebae, including *Chlamydia* spp., *Klebsiella* spp., *Legionella* spp., *Pseudomonas* spp., *Mycobacterium* spp. and *Streptococcus* spp., which makes them completely resistant to water treatment systems and disinfectants used in hospitals (Ovrutsky et al. 2013; Delafont et al. 2016). The term "Trojan horse" has been used to name FLA that serve as reservoirs for

other intracellular microorganisms to multiply, thus serving as vehicles for dissemination of pathogens (Barker and Brown 1994).

This amoeba internalizes, for example, bacteria, and then grouped into a vacuole: upon fusion with the lysosome, a phagolysosome forms. The acidic pH and lysosomal enzymes lysed the phagocytized bacteria. This ability suggests that amoebae serve as a model for interaction studies of bacteria with phagocytic cells in humans. However, the virulence determinants for infection and multiplication in human cells and in amoebae phagocytes do not appear to be the same (Bruggemann et al. 2006; Buchrieser 2011; Siddiqui and Khan 2012).

Some studies have shown that some resistant bacteria to amoeba phagocytosis are able to alter the phagosome environment few minutes after the internalization, as *Legionella pneumophila* and *Pseudomonas aeruginosa*. They modify the phagosome traffic avoiding the entrance in the endocytic way of the host, preventing the immediate phagosome-lysosome fusion, through the construction of a distinct niche that allows the intracellular bacterium replication (Miyake et al. 2006; Bruggemann et al. 2006; Schunder et al. 2010; Denoncourt et al. 2014; Siddiqui et al. 2015).

After internalized non-pathogenic bacteria are killed and used as a source of nutrient, while pathogenic ones modify the *Acanthamoeba* spp. intracellular mechanism, ensuring their survival and multiplication, after being released through vesicles, or by amoeba lysis. Some bacteria do not multiply within the amoeba, they stayed in a dormant state, and after being released into the environment they return to their normal state (Siddiqui and Khan 2012).

To avoid digestion by amoebae, bacteria can express different sets of genes that are responsible for different intracellular microenvironments and facilitates their survival and growth. Proteins whose expression is regulated within intracellular compartments may constitute their potential virulence factor (Miyake et al. 2006). Bacterial secretion systems play a crucial role in providing the bacterial factors involved in these processes to their sites of

action. *Pseudomonas aeruginosa*, for example, produces various enzymes and toxins released by different secretion systems. The type III secretion system (TSS) allows the bacteria to release toxins into cells, thereby inhibiting phagocytosis (Khalifa et al. 2011; Siddiqui and Khan 2014).

Hospitalized patients who uses hospital devices such as endotracheal tubes and catheters are susceptible to *Acanthamoeba* spp. infections with endosymbionts, since these can adhere to biofilms causing lysis and proliferation and causing bacteria survive inside. Currently, this association of endosymbionts multiplying is highly reported, but it is known that it can occur causing extremely serious infections, such as pneumonia or even tuberculosis (Bradbury et al. 2014).

***Acanthamoeba* spp. Ecology in Hospital Environment**

Due to the opportunistic nature of *Acanthamoeba* and its possible role as a reservoir for human pathogens, monitoring this protozoan in settings such as hospitals and health facilities where people are most debilitated and susceptibility to infection is vital (Michel et al. 1995; Rohr et al. 1998; Thomas et al. 2006). Currently investigations on the presence of *Acanthamoeba* in hospital settings are few but we will describe the most important ones here.

Water systems or wetlands

Muchesa et al. (2016) verified the coexistence of free-living amoebae and bacteria in hospital water systems in South Africa. The samples were cultured and submitted to PCR and sequencing molecular techniques. They identified FLA belonging to the genus *Vermamoeba* spp., *Acanthamoeba* spp. and *N. gruberi*. In the first hospital analyzed, the greatest diversity of bacteria present in FLA concomitance was observed in the neonatal ward, especially *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas luteola*, *Rhizobium radiobacter* and *Archromobacter denitrificans*. In the second hospital analyzed, there was *Pseudomonas* and

Staphylococcus in the isolated FLA.

To check the FLA prevalence associated with endosymbionts in Austria, Scheikl and coworkers (2016) analyzed three different cooling towers of a hospital, tap water and shower over 1 year. They used PCR to identify the presence of *Acanthamoeba* spp., *Naegleria* spp., *Paravahlkampfia* spp., *Vahlkampfia* spp., *Singhamoeba* spp., *Wilaertia* spp., *Tetramitus* spp., *Vermamoeba vermiformis*. For the identification of endosymbionts the FISH technique was performed. Identification of endosymbionts was performed by 16S rDNA gene sequencing. Among the positive samples for FLA, prevalence of *Acanthamoeba* spp. The identified endosymbionts were *Paracaedibacter Acanthamoebae*, *Legionella rubrilucens* and *Legionella pneumophila*.

Thomas et al. (2006) present a study based on the biodiversity of amoebae and amoebas resistant to bacteria in a hospital water network. The authors collected samples of water, swabs from taps and showers at the intensive care unit, surgical unit and medical clinic ward and used PCR and 18S rRNA sequencing as a methodology. An *Acanthamoeba polyphaga* strain of was isolated from a tap water swab and survived at temperatures of 44 and 47°C, but did not show growth in this temperature range. Mycobacteria presented higher prevalence, proving that they are directly associated with free-living amoebas in the water networks. In this study, it was demonstrated that mycobacteria can grow in amoebas co-cultures in vitro, and this allowed the isolation of a new species, as *Mycobacterium massiliense*, from a patient's sputum sample.

Trabelsi and coworkers (2016) collected water samples during a period of 4 months from different wards of the Sfax University Hospital (surgical services, intensive care unit, operating room and water storage tanks). FLA were detected in 53.5 % of collected samples from which *Acanthamoeba* were the most prevalent. These isolates belong to T4, T10, and T11 genotypes, and they describe the first report of the T10 and T11 genotype in Tunisia.

Khurana et al. (2015) evaluated the extent of FLA contamination in water sources of

intensive care unit (ICU) of bone marrow transplantation (ICU), transplant ICU, hemodialysis unit and high dependency unit in a tertiary hospital in India. They confirmed by PCR and sequencing the presence of *Acanthamoeba* spp. dos genótipos T3 e T4.

Bagheri et al. (2010) conducted a study in hospitals in 13 cities in Iran. Samples were collected from hot water and cold water taps from different hospital wards. Confirmation of the existence of *Acanthamoeba* spp. was performed using a reverse phase microscopy technique. Based on the morphological characteristics, the presence of *Acanthamoeba* spp. was practically half of the samples, collected at temperatures between 21° C and 48° C, proving a significant presence of these microorganisms in hospitals that receive water from the treatment network.

‘Dry’ or ‘Moist’ Biofilms

In a study by Fukumoto et al. (2016) for the co-existence of *Chlamydia* spp. and *Acanthamoeba* spp. and evaluation of *Chlamydia* spp. pathogenicity. Smear were collected from floor or sink outlet from different hospital environments during the winter and summer in Japan. The isolated samples were cultured and genetic and phylogenetic analyzes were done. The presence of *Acanthamoeba* spp. in 76.7% of the samples, 3 of which contained *Chlamydia* spp. and only one has been shown to be potentially pathogenic, with ample capacity for infection and proliferation. Prevalence appeared to increase in the summer trial, but without statistical significance, potentially indicating a seasonal variation. Meanwhile, there was no difference in prevalence between swabs from either ‘Dry’ or ‘Moist’ conditions or between floors.

Fukumoto et al. (2010) randomly collected samples of the floor, sinks and exits of the air-conditioning collector from a hospital at Hokkaido University, Japan. They used the PCR technique and identified *Parachlamydia acanthamoebae*, an intracellular bacterium that infects free-living amoebae and is considered highly pathogenic in humans with hospital pneumonia, and has great implications for the prevention and control of nosocomial infections. The

association between *Paraclamydia Acanthamoebae* and *Acanthamoeba* spp. has a significant effect on the long-term survival of the bacterium and increases its performance in being able to spread in the hospital environment. The authors demonstrated in vitro that without the presence of *Acanthamoeba* spp. the survival of *Paraclamydia Acanthamoebae* does not exceed the period of 3 days with a temperature of 30°C or 15 days at 15°C.

Dust

In a characterization study of *Acanthamoeba* spp. Costa et al. (2010) collected dust samples from a public hospital in the city of Curitiba, state of Paraná, Brazil. Samples were collected from five different hospital areas. Morphological analyzes of cysts and trophozoites confirmed that they belong to the genus *Acanthamoeba* spp. of group I and group II. The characteristics resemble to *A. astronyxis* and *A. triangularis* species, but this identification by morphological criteria was not reliable, since the morphology may vary due to factors such as cultivation and condition of the samples. They applied PCR technique and sequencing analysis. Isolates were identified as *Acanthamoeba* by PCR with samples that belongs to groups I and II. The authors emphasized that the samples belonging to group II are more pathogenic and include several species usually associated with clinical conditions.

da Silva and da Rosa (2003) evaluated the occurrence of *Acanthamoeba* and *Naegleria* genera in FLA through dust samples from two hospitals in the interior of São Paulo. Amoebas of the genera *Acanthamoeba* and *Naegleria* were found in 45.5% of the samples, of which 41.6% were collected at the university hospital and 50% at the state hospital. Of all, 45.5% were positive for the genus *Acanthamoeba* and 3.8% for the genera *Naegleria*.

Water and biofilm

Muchesa et al. (2015) in a study on the occurrence of free-living amoebas in a teaching hospital in Johannesburg, South Africa. Water and biofilm samples were collected from the theaters, theater sterilization service unit, central sterilization service unit and endoscopy / bronchoscopy unit . Samples of tap water, dry swab and shower water were collected. Approximately 90% of the samples were positive for free-living amoeba. *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia* spp. and *Hartmanella* spp. were identified by morphology. The presence of free-living amoeba in the hospital water network may be a potential health risk.

Analyzing samples collected at a medical center in the United States, Ovrutsky et al. (2013) isolated free-living amoebae and Nontuberculous mycobacteria (NTM). Water and biofilms samples were collected from showerheads and faucets in patient rooms, drinking fountains, the hospital therapy pool, and disinfection units used to sterilize bronchoscopes and endoscopes. FLA were recovered in most of the biofilm samples and the highest prevalence was of the genus *Acanthamoeba* spp. These results were confirmed by the use of the PCR technique. NTM were identified as endosymbiont, that were also more prevalent in biofilm samples, with *M. gordonae* being the most common species.

Dust and Biofilms

In a study carried out in a public hospital from Porto Alegre city, Rio Grande do Sul state, (Carlesso et al. 2007) identified the presence of FLA samples collected from dust and biofilms in 15 different hospital environments. All the analyzed environmental samples indicated the presence of FLA, except for the intensive care center. 35% of all collected samples were positive for FLA, and 34% of them belongs to *Acanthamoeba* spp genus. Among dust samples, kitchen was the area with the highest number of FLA isolates while among the biofilm samples, the drinkers had the highest FLA prevalence.

Lasjerdi et al. (2015) investigated the occurrence of free-living amoebae (FLA) in

immunodeficiency units of hospitals in Tehran, Iran. Dust and biofilm samples from wards serving transplant, pediatric (malignancies), HIV, leukemia and oncology patients of five university hospitals were collected and examined for the presence of FLA using culturing and molecular approaches. A little more than half of the samples were positive for the presence of FLA and *Acanthamoeba* genotype e was the most prevalent between the isolates. The presence of the T4 genotype in medical instruments, including an oxygen mask in an isolation room of a pediatric immunodeficiency clinic, should be of concern to health authorities. Genotypes *Acanthamoeba* T5, *Hartmannella vermiformis* and *Vahlkampfia avara* were also present.

Clinical samples and water

Bradbury et al. (2014) conducted a study at Royal Hobart Hospital in Tasmania to evaluate the possibility of colonization of the respiratory and urinary tract of intensive care patients with FLA. Patient clinical samples and water samples were collected from Intensive Care Unit, all of them being cultured and tested by the PCR method. *Acanthamoeba* spp. was isolated from two patients collected at one week apart and one from a lavatory of one ICU patient. The first patient sample presented a large *Acanthamoeba* spp. growth and was collected while the patient was intubated. The second sample had a moderate growth and was collected after patient extubating when were transferred to the general ward. Although the colonization of the respiratory tract of ICU patients with *Acanthamoeba* spp. may appear to be a rare event, this study proves that it may occur and is not commonly detected because very specific methods are required for clinical diagnosis. This further reinforces the role of *Acanthamoeba* spp. also as a carrier of bacterial pathogens in the airways of intensive care patients.

Desinfection Treatments

Ventilation and air conditioning systems provide an effective way for airborne

transmission of contaminants that may be present on hospital environment. Microorganisms resistant to disinfection, even in small quantities constitute a potential risk to infect an individual (Cervero-Aragó et al. 2015). *Acanthamoeba* spp. outbreaks are caused by their cysts and trophozoites. These structures have been found in air, soil and water sources, where treatment methods and laboratory analyzes are inefficient to detect or remove them (Miller et al. 2017). The innumerable gaps on knowledge about the presence of these parasites in the environment and the ineffectiveness of disinfection are important factors for the dissemination of these pathogens (Triassi et al. 2010). Nowadays, physical and chemical methods are used to clarify and disinfect water in order to inactivate cysts and oocysts. Several studies are designed to guide sanitary professionals for most effective methods (Pagnier et al. 2008; Dupuy et al. 2011; Brief et al. 2017).

Some methods have been tested for disinfection of protozoa such as Chlorine and its derivatives, Ozone, Interactive, Ultraviolet Light, Solar Radiation and Boil. The choice of the disinfection method for inactivation of these parasites should take into account the most appropriate cost, benefit, and do not pose a risk to the population(Proctor et al. 2018).

In a recent study, researchers tested three disinfectants where none them were able to completely eradicate FLA. Even at higher concentrations than those recommended by manufacturers, advocating a deeper investigation of the antimicrobial spectra of commercial disinfectants in use for the maintenance and disinfection of conditioners of air (García et al. 2007).

Hospital heating, ventilation and air-conditioning (HVAC) systems plays an important role in filtering and circulating air providing an adequate environment for patients and personnel. Besides bleaching and cleaning air devices some authors suggests that with the implementation of the preventive maintenance program, the benefits of the research came doubled folded; the reliability of the HVAC equipment increased and high utility costs which

were incurred due to the frequent breakdowns and poor utilization of machines and employees reduced significantly. The researchers recommend the preventive maintenance for the HVAC system to all hospitals that should lead to good health promotion. They suggest that a well-designed preventive maintenance program is a good start for a hospital that does not have the resources to invest in automated cleaning systems (Mwanza and Mutenhabundo 2013).

***Acanthamoeba* spp. and air quality in hospitals**

Some studies have shown that infections due to lack of air quality control in hospital settings may be associated with fungal, bacterial and protozoal contamination (Etchebehere, A. et al 2005). Solomon et al. (2017) verified the presence of antimicrobial resistant bacteria in air samples and highlighted the possibility of causing serious nosocomial infections. In Saudi Arabia, an investigation carried out at a large local hospital highlighted the presence of high amounts of fungi of the genus *Cladosporium* and *Penicillium*, being superior to what is indicated in the air quality guidelines (El-Sharkawy and Noweir 2014). In Brazil, a study done in Piauí evaluated the presence of the fungal microbiota in air conditioning units of intensive care units of public and private hospitals, also pointed out that air conditioners should be cleaned fortnightly (Mobin and Salmito 2006).

The World Health Organization has shown concern about indoor air quality, and despite the existence of standards that are not always adopted leading to the difficulty of air quality maintenance in hospital settings (Hänninen 2011; Mota R. et al., 2014). The air quality in hospital environments is related to the proper maintenance and cleaning of air conditioning systems, since they can serve as sources for the formation of microbial biofilms, as well as trigger the process of dissemination of pathogens (Leung and Chan 2006). Due to the opportunistic nature of *Acanthamoeba* spp. and its possible role as a reservoir of pathogens, the monitoring of this protozoan in hospital environments becomes important and can be used as

an air quality biomarker in hospitals (Chan et al. 2011; Ooi et al. 2016).

Thus, it is important to understand the nature of the presence of *Acanthamoeba* in the internal environment, especially in air conditioning systems and its possible role as carrier of bacteria can serve as potential danger to patients in debilitated state (OOI et al. 2016). As *Acanthamoeba* spp. is ubiquitous, its use as an air quality marker should be considered as a biosafety measure in further studies and to overcome obstacles hitherto insurmountable on nosocomial infections.

Concluding remarks

Knowing indoor air quality plays an important role in preventing hospital infections and due to the opportunistic nature of *Acanthamoeba* spp. and its reservoir relation with other pathogens, we can suggest their use as an important biomarker for air quality control.

Funding information

The authors thank the Centro de Treinamento e Pesquisa em Biotecnologia (CPTBio/UNISC).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Ager BP, Tickner JA (2007) THE CONTROL OF MICROBIOLOGICAL HAZARDS ASSOCIATED WITH AIR-CONDITIONING AND VENTILATION SYSTEMS <xref ref-type="fn" rid="fn1">*</xref>. Ann Occup Hyg 27:341–358. doi: 10.1093/annhyg/27.4.341

- Anzil AP, Rao C, Wrzolek MA, et al (1991) Amebic meningoencephalitis in a patient with AIDS caused by a newly recognized opportunistic pathogen. *Leptomyxid ameba*. *Arch Pathol Lab Med* 115:21–25
- Astorga B, Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, et al (2011) *Acanthamoeba* belonging to T3, T4, and T11: Genotypes isolated from air-conditioning units in Santiago, Chile. *J Eukaryot Microbiol* 58:542–544. doi: 10.1111/j.1550-7408.2011.00584.x
- Bagheri H, Shafiei R, Shafiei F, Sajjadi S (2010) Isolation of *acanthamoeba* spp. From drinking waters in several hospitals of iran. *Iran J Parasitol* 5:19–25
- Balczun C, Scheid PL (2017) Free-living amoebae as hosts for and vectors of intracellular microorganisms with public health significance. *Viruses* 9:. doi: 10.3390/v9040065
- BAND RN, MOHRLOK S (1973) The Cell Cycle and Induced Amitosis in *Acanthamoeba*. *J Protozool* 20:654–657. doi: 10.1111/j.1550-7408.1973.tb03592.x
- Barbeau J, Buhler T (2001) Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. *Res Microbiol* 152:753–760. doi: 10.1016/S0923-2508(01)01256-6
- Barker J, Brown MRW (1994) Trojan Horses of the microbial world : protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* 1253–1259. doi: 10.1099/00221287-140-6-1253
- BECKER-FINCO A, COSTA AO, SILVA SK, et al (2013) Physiological, morphological, and immunochemical parameters used for the characterization of clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba*. *Parasitology* 140:396–405. doi: 10.1017/S0031182012001746
- Ben Haj Khalifa A, Moissenet D, Vu Thien H, Khedher M (2011) [Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation]. *Ann Biol Clin (Paris)* 69:393–403. doi: 10.1684/abc.2011.0589
- Bier JW, Sawyer TK (1990) Amoebae isolated from laboratory eyewash stations. *Curr Microbiol* 20:349–350. doi: 10.1007/BF02091918

- Bradbury RS, French LP, Blizzard L (2014) Prevalence of *Acanthamoeba* spp. in Tasmanian intensive care clinical specimens. *J Hosp Infect* 86:178–181. doi: 10.1016/j.jhin.2013.12.009
- Brief RS, Bernath T, Costa D, et al (2017) Efficiency of water disinfectants against *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba*. *Water Res* 4:1087–1094. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01245.x
- Bruggemann H, Hagman A, Jules M, et al (2006) Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* 8:1228–1240. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00703.x
- Buchrieser C (2011) *Legionella*: from protozoa to humans. *Front Microbiol* 2:. doi: 10.3389/fmicb.2011.00182
- Carlesso AM, Simonetti AB, Artuso GL, Rott MB (2007) Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes de hospital público da Cidade de Porto Alegre, RS. *Rev Soc Bras Med Trop* 40:316–320. doi: 10.1590/S0037-86822007000300013
- Castrillón J, Orozco L (2013) *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. *Rev Chil Infectología* 30:147–155. doi: 10.4067/S0716-10182013000200005
- Castro-Artavia E, Retana-Moreira L, Lorenzo-Morales J, Abrahams-Sandí E (2017) Potentially pathogenic *Acanthamoeba* genotype T4 isolated from dental units and emergency combination showers. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 112:817–821. doi: 10.1590/0074-02760170147
- Caumo K, Rott MB (2011) *Acta Tropica* *Acanthamoeba* T3 , T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. *Acta Trop* 117:233–235. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.12.008
- Cervero-Aragó S, Rodríguez-Martínez S, Puertas-Bennasar A, Araujo RM (2015) Effect of

- common drinking water disinfectants, chlorine and heat, on free *Legionella* and amoebae-associated *Legionella*. *PLoS One* 10:1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0134726
- Chan LL, Mak JW, Low YT, et al (2011) Isolation and characterization of *Acanthamoeba* spp. from air-conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. *Acta Trop* 117:23–30. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.09.004
- Corsaro D, Walochnik J, Köhler M, Rott MB (2015) *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitol Res* 114:2481–2490. doi: 10.1007/s00436-015-4445-8
- Costa AO, Castro EA, Ferreira GA, et al (2010) Characterization of *acanthamoeba* isolates from dust of a public hospital in Curitiba, Paraná, Brazil. *J Eukaryot Microbiol* 57:70–5. doi: 10.1111/j.1550-7408.2009.00453.x
- Coulon C, Collignon A, McDonnell G, Thomas V (2010) Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. *J Clin Microbiol* 48:2689–2697. doi: 10.1128/JCM.00309-10
- CULBERTSON CG, SMITH JW, COHEN HK, MINNER JR (1959) Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Am J Pathol* 35:185–97
- da Silva MA, da Rosa JA (2003) Isolation of potentially pathogenic free-living amoebas in hospital dust. *Rev Saude Publica* 37:242–6
- 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. doi: 10.1016/j.watres.2016.05.044
- Dendana F, Sellami H, Jarraya F, et al (2008) Free-living amoebae (FLA): detection, morphological and molecular identification of *Acanthamoeba* genus in the hydraulic system of an haemodialysis unit in Tunisia. *Parasite* 15:137–142. doi:

10.1051/parasite/2008152137

Denoncourt AM, Paquet VE, Charette SJ (2014) Potential role of bacteria packaging by protozoa in the persistence and transmission of pathogenic bacteria. *Front Microbiol* 5:1–11. doi: 10.3389/fmicb.2014.00240

Dupuy M, Mazoua S, Berne F, et al (2011) Efficiency of water disinfectants against *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba*. *Water Res* 45:1087–1094. doi: 10.1016/j.watres.2010.10.025

El-Sharkawy M, Noweir MH (2014) Indoor air quality levels in a University Hospital in the Eastern Province of Saudi Arabia. *J Fam Community Med* 21:39. doi: 10.4103/2230-8229.128778

el Sibae MM (1993) Detection of free-living amoeba (*Acanthamoeba polyphagia*) in the air conditioning systems. *J Egypt Soc Parasitol* 23:687–90

ETCHEBEHERE, A.; SERVILIERI, K.M.; REGAZZI, R.D.; PEDROSO, M.Z.; SARTORELLI, E.M.; CARLOS, A.L.; NABESHIMA, M.A.; CARDOSO, M.M.; NUNES NR. DT (2005) A metrologia participa do controle de infecções hospitalares cuidando da qualidade do Ar. *METROSAÚDE- Simpósio Metrol na área da Saúde* 1–6

Fukumoto T, Matsuo J, Hayashi Y, et al (2010) Impact of free-living amoebae on presence of *Parachlamydia acanthamoebae* in the hospital environment and its survival in vitro without requirement for amoebae. *J Clin Microbiol* 48:3360–3365. doi: 10.1128/JCM.00366-10

Fukumoto T, Matsuo J, Okubo T, et al (2016) *Acanthamoeba* containing endosymbiotic chlamydia isolated from hospital environments and its potential role in inflammatory exacerbation. *BMC Microbiol* 16:292. doi: 10.1016/j.jfo.2016.09.010

García MT, Jones S, Pelaz C, et al (2007) *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environ Microbiol* 9:1267–1277. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01245.x

- Geisen S, Fiore-Donno AM, Walochnik J, Bonkowski M (2014) Acanthamoeba everywhere: high diversity of Acanthamoeba in soils. *Parasitol Res* 113:3151–3158. doi: 10.1007/s00436-014-3976-8
- Greub G, Raoult D (2004) Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. *Clin Microbiol Rev* 17:413–433. doi: 10.1128/CMR.17.2.413-433.2004
- Guimaraes AJ, Gomes KX, Cortines JR, et al (2016) Acanthamoeba spp. as a universal host for pathogenic microorganisms: One bridge from environment to host virulence. *Microbiol Res* 193:30–38. doi: 10.1016/j.micres.2016.08.001
- Haburchak DR (2017) Acanthamoeba Infection. In: Medscape. <https://emedicine.medscape.com/article/211214-overview#a4>. Accessed 15 Mar 2019
- Hänninen OO (2011) WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mold. *Fundam mold growth indoor Environ Strateg Heal living* 277–302. doi: 10.3920/978-90-8686-722-6_10
- Hassan A, Farouk H, Hassanein F, et al (2012) Acanthamoeba contamination of hemodialysis and dental units in Alexandria, Egypt: A neglected potential source of infection. *J Infect Public Health* 5:304–310. doi: 10.1016/j.jiph.2012.06.001
- Kao PM, Hsu BM, Chen NH, et al (2012) Isolation and identification of Acanthamoeba species from thermal spring environments in southern Taiwan. *Exp Parasitol* 130:354–358. doi: 10.1016/j.exppara.2012.02.008
- 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* 6:309–324. doi: 10.1111/1758-2229.12155
- Khan NA (2006) Acanthamoeba : biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev* 30:564–595. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x
- Khurana S, Biswal M, Kaur H, et al (2015) Free living amoebae in water sources of critical

- units in a tertiary care hospital in India. *Indian J Med Microbiol* 33:343–348. doi: 10.4103/0255-0857.158543
- Kingston D, Warhurst DC (1969) Isolation Of Amoebae From The Air. *J Med Microbiol* 2:27–36. doi: 10.1099/00222615-2-1-27
- Lasjerdi Z, Niyiyati M, Lorenzo-Morales J, et al (2015) Ophthalmology hospital wards contamination to pathogenic free living Amoebae in Iran. *Acta Parasitol* 60:417–422. doi: 10.1515/ap-2015-0057
- Leung M, Chan AHS (2006) Control and management of hospital indoor air quality. *Med Sci Monit* 12:SR17-23. doi: 10.1007/s42241-018-0103-9
- Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J (2015) An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite* 22:10. doi: 10.1051/parasite/2015010
- Lorenzo-Morales J, Lindo JF, Martinez E, et al (2005a) Pathogenic *Acanthamoeba* strains from water sources in Jamaica, West Indies. *Ann Trop Med Parasitol* 99:751–758. doi: 10.1179/136485905X65215
- Lorenzo-Morales J, Ortega-Rivas A, Foronda P, et al (2005b) Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitol Res* 95:273–277. doi: 10.1007/s00436-005-1301-2
- M Rezaeian, M Niyiyati, Sh Farnia AMH (2008) Isolation of *Acanthamoeba* Spp. from Different Environmental Sources. *Iran J Parasitol* 3:44–47
- Marciano-Cabral F, Cabral G (2003) *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. *Clin Microbiol Rev* 16:273–307. doi: 10.1128/CMR.16.2.273-307.2003
- Mazur T, Hadaś E, Iwanicka I (1995) The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Trop Med Parasitol* 46:106–8
- Michel R, Burghardt H, Bergmann H (1995) *Acanthamoeba*, naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated

- drinking water system in a hospital. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 196:532–44
- Miller HC, Morgan MJ, Wylie JT, et al (2017) Elimination of *Naegleria fowleri* from bulk water and biofilm in an operational drinking water distribution system. *Water Res* 110:15–26. doi: 10.1016/j.watres.2016.11.061
- Miyake M, Fukui T, Imai Y (2006) Differences in protein synthesis between wild type and intracellular growth-deficient strains of *Legionella pneumophila* in U937 and *Acanthamoeba polyphaga*. *Microb Pathog* 40:161–170. doi: 10.1016/j.micpath.2005.12.005
- Mobin M, Salmito M do A (2006) Microbiota fúngica dos condicionadores de ar nas unidades de terapia intensiva de Teresina, PI. *Rev Soc Bras Med Trop* 39:556–559. doi: 10.1590/S0037-86822006000600009
- Mota R.; Gil T.; Lima B.; Moraes F.; Farias A. (2014) Qualidade do ar interno no ambiente hospitalar: uma revisão integrativa. *Rev Saúde* 8:44–52
- Muchesa P, Barnard TG, Bartie C (2015) The prevalence of free-living amoebae in a South African hospital water distribution system. *S Afr J Sci* 111:3–5. doi: 10.17159/sajs.2015/20140278
- Muchesa P, Leifels M, Jurzik L, et al (2016) Free-living amoebae isolated from a hospital water system in South Africa: A potential source of nosocomial and occupational infection. *Water Sci. Technol. Water Supply* 16:70–78
- Mwanza B, Mutenhabundo W (2013) Impact of a reentive Maintenance Program for HVAC Systems in Hospitals: A case study of Kitwe Central Hospital. *Int J Sci Eng Res* 4:172–177
- Neff RJ (1957) Purification, Axenic Cultivation, and Description of a Soil Amoeba, *Acanthamoeba* sp. *J Protozool* 4:176–182. doi: 10.1111/j.1550-7408.1957.tb02505.x
- Niyiyati M, Lorenzo-Morales J, Rahimi F, et al (2009) Isolation and genotyping of potentially

- pathogenic *Acanthamoeba* strains from dust sources in Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103:425–427. doi: 10.1016/j.trstmh.2008.12.007
- OOI SS, MAK JW, CHEN DKF, AMBU S (2016) The correlation of *Acanthamoeba* from the ventilation system with other environmental parameters in commercial buildings as possible indicator for indoor air quality. *Ind Heal Heal* 55:35–45. doi: 10.2486/indhealth.2015-0218
- Ovrutsky AR, Chan ED, Kartalija M, et al (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* 79:3185–3192. doi: 10.1128/AEM.03823-12
- Page FC (1988) A new key to freshwater and soil gymnamoebae : with instructions for culture. Freshwater Biological Association Scientific Publications, Cumbria, UK
- 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* 10:1135–1144. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01530.x
- Perçin D (2016) Sterilization practices and hospital infections: Is there a relationship? *Int J Antisepsis Disinfect Steriliz* 1:19–22. doi: 10.14744/ijads.2016.76476
- Proctor CR, Reimann M, Vriens B, Hammes F (2018) Biofilms in shower hoses. *Water Res* 131:274–286. doi: 10.1016/j.watres.2017.12.027
- Pussard, R. Pons RM-P (1977) Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa: Amoebida). *Protistologica* 13:557–598
- Rohr U, Weber S, Michel R, et al (1998) Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Appl Environ Microbiol* 64:1822–1824
- Rowland BM (2003) Ion of Dental Unit Waterlines : r Mouth ? What is Your. *Clin Microbiol*

- News1 25:73–77. doi: 10.1016/S0196-4399(03)80016-8
- Sandstrom G, Saeed A, Abd H (2011) Acanthamoeba-bacteria: a model to study host interaction with human pathogens. *Curr Drug Targets* 12:936–941
- Scheikl U, Tsao HF, Horn M, et al (2016) Free-living amoebae and their associated bacteria in Austrian cooling towers: a 1-year routine screening. *Parasitol Res* 115:3365–3374. doi: 10.1007/s00436-016-5097-z
- Schroeder JM, Booton GC, Hay J, et al (2001) Use of Subgenetic 18S Ribosomal DNA PCR and Sequencing for Genus and Genotype Identification of Acanthamoebae from Humans with Keratitis and from Sewage Sludge. *J Clin Microbiol* 39:1903–1911. doi: 10.1128/JCM.39.5.1903-1911.2001
- Schunder E, Adam P, Higa F, et al (2010) Phospholipase PlaB is a new virulence factor of *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol* 300:313–323. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.01.002
- Schuster FL, Visvesvara GS (2004) Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 34:1001–1027. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.06.004
- Siddiqui R, Dudley R, Khan NA (2012) Acanthamoeba differentiation: A two-faced drama of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Parasitology* 139:826–834. doi: 10.1017/S0031182012000042
- Siddiqui R, Khan NA (2012) Photochemotherapeutic strategies against Acanthamoeba keratitis. *AMB Express* 2:1. doi: 10.1186/2191-0855-2-47
- Siddiqui R, Khan NA (2014) Primary Amoebic Meningoencephalitis Caused by *Naegleria fowleri*: An Old Enemy Presenting New Challenges. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e3017. doi: 10.1371/journal.pntd.0003017
- Siddiqui R, Lakhundi S, Khan NA (2015) Interactions of *Pseudomonas aeruginosa* and *Corynebacterium* spp. with non-phagocytic brain microvascular endothelial cells and

- phagocytic *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitol Res* 114:2349–2356. doi: 10.1007/s00436-015-4432-0
- Solomon FB, Wadilo FW, Arota AA, Abraham YL (2017) Antibiotic resistant airborne bacteria and their multidrug resistance pattern at University teaching referral Hospital in South Ethiopia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 16:1–7. doi: 10.1186/s12941-017-0204-2
- Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, et al (1998) The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J Eukaryot Microbiol* 45:45–54. doi: 10.1111/j.1550-7408.1998.tb05068.x
- 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* 72:2428–2438. doi: 10.1128/AEM.72.4.2428-2438.2006
- Trabelsi H, Dendana F, Neji S, et al (2016) Morphological and molecular identification of free living amoeba isolated from hospital water in Tunisia. *Parasitol Res* 115:431–435. doi: 10.1007/s00436-015-4788-1
- Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, et al (2012) Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Pathol Biol* 60:399–405. doi: 10.1016/j.patbio.2012.03.002
- Triassi M, Liguori G, Bagattini M, et al (2010) Automated cleaning of fan coil units with a natural detergent-disinfectant product. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 9:29. doi: 10.1186/1476-0711-9-29
- Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL (2007) Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50:1–26. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x
- WARHURST DC, ARMSTRONG JA (1968) Study of a Small Amoeba from Mammalian Cell Cultures Infected with “Ryan Virus”.” *J Gen Microbiol* 50:207–215. doi:

10.1099/00221287-50-2-207

7. DISCUSSÃO GERAL

O presente estudo avaliou a presença de AVL e sua relação com endossimbiontes na poeira de ar condicionado do Hospital Santa Cruz do Sul (HSC). Apesar de serem amplamente encontradas nos mais diversos habitats, não há alta incidência de doenças ocasionadas por este gênero de AVL. Os trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. são a forma metabolicamente ativa e infectante que acometem humanos, resultando numa complexa interação entre patógeno e hospedeiro. Os gêneros *Acanthamoeba*, *Naegleria* e *Balamuthia* são considerados potencialmente patogênicos, pois carregam bactérias, que podem se replicar dentro destes micro-organismos tornando-se resistentes às amebas.

Os indivíduos suscetíveis às infecções por *Acanthamoeba* spp. são usuários de lentes de contato e imunodeprimidos, como por exemplo, portadores de HIV. Essas infecções podem ocorrer por inalação ou por feridas presentes na pele, sendo as principais, encefalite amebiana granulomatosa, uma infecção que atinge o SNC e na maioria dos casos é rápida e fatal e ceratite amebiana (DA SILVA; DA ROSA, 2003b; NIYYATI; REZAEIAN, 2015; QVARNSTROM et al., 2006).

Os resultados deste documento foram apresentados em forma de artigos, sendo o primeiro artigo uma avaliação da ocorrência de *Acanthamoeba* spp. carreadoras de *Pseudomonas* spp. em poeira de ar condicionado de diferentes ambientes hospitalares. Neste estudo foi observada uma frequência de isolamento da *Acanthamoeba* spp. mais elevada, em relação a relatada em outros estudos realizados em hospitais no Brasil (CARLESSO et al., 2010b; COSTA et al., 2010b; DA SILVA; DA ROSA, 2003b). Verificou-se também que 70% dos isolados foram classificados como potencialmente patogênicos, diferindo dos resultados encontrados na literatura principalmente em ambientes hospitalares, o que nos mostra a importância da reavaliação dos métodos de desinfecção. Foram analisados os genótipos destes micro-organismos, onde 123 (72,4%) isolados de *Acanthamoeba* spp. foram identificados como pertencentes ao genótipo T4, 54 (44%) dos quais estavam restritos ao ambiente da UTI (adultos e pediátrico). Os outros 27,6% correspondem aos genótipos (T3, T5 e T11). Os quatro genótipos aqui identificados têm uma ampla distribuição ambiental relatada em amostras de solo (BOOTON et al., 2004; REYES-BATLLE et al., 2016; TODD et al., 2015), água (BOOTON et al., 2004; CAUMO; ROTT, 2011; SENTE et al., 2016) e poeira (NIYYATI et al., 2009). Este estudo também

salientou que é necessário que os profissionais de saúde sejam treinados a fim de auxiliar na melhoria de medidas de prevenção e controle de infecção relacionadas as AVL nos ambientes hospitalares. Os métodos de desinfecção atualmente não são suficientes para a eliminação destes microrganismos, ocasionando riscos graves aos pacientes hospitalizados nas instituições de saúde, sendo que mais estudos devem ser realizados para melhorar a qualidade do ar nas instituições de saúde.

O segundo artigo resultou numa revisão da literatura sobre a ocorrência de *Acanthamoeba* spp. com a idéia de aprofundar a questão do monitoramento das AVL no ambiente hospitalar. Pois, se as espécies de *Acanthamoeba* spp. são capazes de hospedar uma diversidade de micro-organismos patogênicos que levam a doenças infecciosas dentro do ambiente hospitalar, se faz urgente a vigilância dos indivíduos imunocomprometidos que são suscetíveis a diferentes infecções. O nível de risco para a saúde humana e essas associações no ambiente hospitalar é desconhecido, e parte desse problema pode estar relacionado justamente pela falta de análises e correlação entre a exposição dos indivíduos internados em hospitais à ameba e o início dos sintomas que cada um pode desenvolver em diferentes períodos de tempo. Logo, o artigo de revisão representou uma visão geral atual de *Acanthamoeba* spp. em ambientes hospitalares fornecendo orientações sobre como lidar com sua presença deste micro-organismos.

De acordo com os dados encontrados e reportados nos artigos científicos redigidos à partir deste trabalho, observa-se que o investimento no estudo da ecologia e distribuição de patógenos não-entéricos no ambiente hospitalar se faz necessário para melhor compreender a potencial ameaça de AVL para a saúde humana, sendo que um dos maiores desafios ainda esbarra n monitoramento efetivo das AVL nesses ambientes que abrigam indivíduos vulneráveis.

8. CONCLUSÃO

Através da análise das amostras coletadas em diferentes ambientes do hospital foi possível observar o crescimento amebiano, sendo os isolados identificados como *Acanthamoeba* spp., compatíveis com o grupo II segundo os critérios de Page (1988) (PAGE, 1988).

Os ensaios de patogenicidade por parâmetros fisiológicos demonstraram majoritariamente a presença de isolados patogênicos circulantes no hospital.

Os isolados dos diferentes ambientes do hospital analisados neste estudo foram confirmados como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* e identificados pertencentes aos genótipos T3, T4, T5 e T11. A identificação da prevalência do genótipo T4 se mostrou concordante com os descritos na literatura.

Como endossimbionte de *Acanthamoeba* spp foi identificada a presença de *Pseudomonas aeruginosas*.

Portanto, de acordo com os achados do presente estudo, observou-se que, assim como esta relatado na literatura, as espécies de *Acanthamoeba* spp. podem servir como possíveis fontes de disseminação de infecções relacionadas à assistência à saúde, pois exercem a função de reservatórios de micro-organismos patogênicos em ambientes hospitalares.

Ressaltando que somente a *Acanthamoeba* spp. pode causar infecções em humanos, e isso parece está ligado aos genótipos encontrados neste gênero. Além, disso cabe lembrar que os indivíduos hospitalizados são frequentemente suscetíveis às infecções podendo ser acometidos por infecções causadas por esses micro-organismos.

Sendo assim, um maior número de estudos necessita ser conduzidos para melhor obter dados que designem *Acanthamoeba* spp como marcador de qualidade microbiológica do ar em ambiente hospitalar.

Visto que no presente estudo todos os isolados carreavam bactérias em seu interior, identificando a necessidade de aprimoramento dos procedimentos de desinfecção visando o controle da presença de *Acanthamoeba* spp e outros micro-organismos nos sistemas de ar condicionado do hospital analisado. O presente estudo foi pioneiro na dos aparelhos de ar condicionado deste hospital.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADÉKAMBI, T. et al. Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 72, n. 9, p. 5974–5981, 2006.
- AICHELBURG, A. C. et al. Successful Treatment of Disseminated *Acanthamoeba* sp. Infection with Miltefosine. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 1743–1746, 2008. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/11/07-0854_article.htm>
- AMANN, R. I.; KRUMHOLZ, L.; STAHL, D. A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 172, n. 2, p. 762–770, 1990.
- ASTORGA, B. et al. *Acanthamoeba* belonging to T3, T4, and T11: Genotypes isolated from air-conditioning units in Santiago, Chile. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s. l.], v. 58, n. 6, p. 542–544, 2011.
- BAIG, A. M. Primary Amoebic Meningoencephalitis: Neurochemotaxis and Neurotropic Preferences of *Naegleria fowleri*. **ACS Chemical Neuroscience**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 1026–1029, 2016. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscchemneuro.6b00197>>
- BALCZUN, C.; SCHEID, P. L. Free-living amoebae as hosts for and vectors of intracellular microorganisms with public health significance. **Viruses**, [s. l.], v. 9, n. 4, 2017.
- BARETE, S. et al. Fatal Disseminated *Acanthamoeba lenticulata* Acanthamebiasis in a Heart Transplant Patient. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 736–738, 2007. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/5/06-1347_article.htm>
- BEN HAJ KHALIFA, A. et al. [Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation]. **Annales de biologie clinique**, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 393–403, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21896403>>
- BOOTON, G. C. et al. Molecular and Physiological Evaluation of Subtropical Environmental Isolates of *Acanthamoeba* spp., Causal Agent of *Acanthamoeba* Keratitis. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 192–200, 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1550-7408.2004.tb00545.x>>
- BOOTON, G. C. et al. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 1689–1693, 2005.
- BOOTON, G. C. et al. Genotypic Identification of *Acanthamoeba* sp. Isolates Associated With an Outbreak of *Acanthamoeba* Keratitis. **Cornea**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 673–676, 2009. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003226-200907000-00010>>
- BOTTARI, B. et al. Application of FISH technology for microbiological analysis: Current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 73, n. 3, p. 485–494, 2006.
- BRADBURY, R. S.; FRENCH, L. P.; BLIZZARD, L. Prevalence of *Acanthamoeba* spp. in Tasmanian intensive care clinical specimens. **The Journal of hospital infection**, School of Medicine, University of Tasmania, Medical Sciences Building, Liverpool Street, Hobart, Tasmania, Australia; School of Medical and Applied Sciences, Central Queensland University, Bruce Highway, North Rockhampton, Queensland, Australia. *Electroni*, England, v. 86, v. 2014/02/18, n. 3, p. 178–181, 2014.
- BRASIL. **Resolução RE nº 9, de 16 de janeiro de 2003** **Diário Oficial da União, Poder Executivo**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d094d3004e5f8dee981ddcd762e8a5ec/Resolucao_RE_n_09.pdf?MOD=AJPERES>.
- BRASIL. **Lei nº 13.589, de 4 de janeiro de 2018**. [s.l: s.n.].
- BRUGGEMANN, H. et al. Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 1228–1240, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462->

5822.2006.00703.x>

CABELLO-VÍLCHEZ, A. M. et al. The isolation of *Balamuthia mandrillaris* from environmental sources from Peru. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 113, n. 7, p. 2509–2513, 2014.

CARDAS, M.; KHAN, N. A.; ALSAM, S. *Staphylococcus aureus* exhibit similarities in their interactions with *Acanthamoeba* and ThP1 macrophage-like cells. **Experimental Parasitology**, United States, v. 132, n. 4, p. 513–518, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001448941200255X>>

CARLESSO, A. M. et al. Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes de hospital público da Cidade de Porto Alegre, RS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 316–320, 2007.

CARLESSO, A. M. et al. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. **Curr Microbiol**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, Porto Alegre, RS, CEP 90050170, Brazil. anacarlesso@yahoo.com.br, v. 60, v. 2009/10/21, p. 185–190, 2010. a.

CARLESSO, A. M. et al. Potentially Pathogenic *Acanthamoeba* Isolated from a Hospital in Brazil. **Current Microbiology**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, Porto Alegre, RS, CEP 90050170, Brazil. anacarlesso@yahoo.com.br, United States, v. 60, v. 2009/10/21, n. 3, p. 185–190, 2010. b. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00284-009-9523-7>>

CASTRILLÓN, J.; OROZCO, L. *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. **Revista Chilena Infectología**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 147–155, 2013.

CAUMO, K.; ROTT, M. B. *Acta Tropica Acanthamoeba* T3 , T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 117, n. 3, p. 233–235, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.12.008>>

CERMEÑO, J. R. et al. Meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*. Epidemiological study in Anzoátegui State, Venezuela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 264–268, 2006.

CHAN, L. L. et al. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* spp. from air-conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 117, n. 1, p. 23–30, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.09.004>>

COPE, J. R. et al. Primary Amebic Meningoencephalitis Associated With Rafting on an Artificial Whitewater River: Case Report and Environmental Investigation. **Clinical Infectious Diseases**, United States, v. 66, n. 4, p. 548–553, 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article/66/4/548/4161734>>

CORSARO, D. et al. Molecular identification of bacterial endosymbionts of *Sappinia* strains. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 116, n. 2, p. 549–558, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-016-5319-4>>

CORSARO, D.; VENDITTI, D. Nuclear Group I introns with homing endonuclease genes in *Acanthamoeba* genotype T4. **European Journal of Protistology**, [s. l.], v. 66, p. 26–35, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0932473918300610>>

COSTA, A. O. et al. Characterization of *Acanthamoeba* isolates from dust of a public hospital in Curitiba, Parana, Brazil. **J Eukaryot Microbiol**, Departamento de Patologia Basica, Sector de Ciencias Biologicas, Universidade Federal do Parana, Curitiba, Parana, 81531-990, Brazil. adrincosta@ufpr.br, v. 57, v. 2009/12/18, p. 70–75, 2010. a.

COSTA, A. O. et al. Characterization of *Acanthamoeba* isolates from dust of a public hospital in Curitiba, Paraná, Brazil. **The Journal of eukaryotic microbiology**, Departamento de Patologia Basica, Sector de Ciencias Biologicas, Universidade Federal do Parana, Curitiba, Parana, 81531-990, Brazil. adrincosta@ufpr.br, v. 57, v. 2009/12/18, n. 1, p. 70–5, 2010. b. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1550-7408.2009.00453.x>>

COTTRELL, M. T.; KIRCHMAN, D. L. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 12, p. 5116–5122, 2000.

CROZETTA, M. A. de S. **Identificação morfológica e molecular de amebas de vida livre do gênero Acanthamoeba isoladas em poeira de ambiente hospitalar**. 2007. Universidade Federal do Paraná, [s. l.], 2007. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/15728>>

CURSONS, R. T. M.; BROWN, T. J.; KEYS, E. A. Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae: In axenic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 62–66, 1980.

DA SILVA, M. A.; DA ROSA, J. A. Isolation of potentially pathogenic free-living amoebas in hospital dust. **Revista de saúde pública**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 242–6, 2003. a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12700848>>

DA SILVA, M. A.; DA ROSA, J. A. Isolation of potentially pathogenic free-living amoebas in hospital dust. **Revista de saúde pública**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 242–6, 2003. b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12700848>>

DART, J. K. G.; SAW, V. P. J.; KILVINGTON, S. Acanthamoeba keratitis: diagnosis and treatment update 2009. **American journal of ophthalmology**, United States, v. 148, n. 4, p. 487–499.e2, 2009.

DE CARLI, G. A. **Parasitologia Clínica - Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para Diagnóstico das Parasitoses Humanas**. Rio de Janeiro.

DELAFONT, V. et al. Environmental factors shaping cultured free-living amoebae and their associated bacterial community within drinking water network. **Water Research**, [s. l.], v. 100, p. 382–392, 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135416303694>>

DENDANA, F. et al. Acanthamoeba T4 genotype associated with keratitis infections in Tunisia. **Parasitology research**, Germany, v. 112, n. 1, p. 401–405, 2013.

DENONCOURT, A. M.; PAQUET, V. E.; CHARETTE, S. J. Potential role of bacteria packaging by protozoa in the persistence and transmission of pathogenic bacteria. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 5, n. MAY, p. 1–11, 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00240/abstract>>

DUARTE, J. L. et al. Morphological, genotypic, and physiological characterization of Acanthamoeba isolates from keratitis patients and the domestic environment in Vitória, Espírito Santo, Brazil. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 135, n. 1, p. 9–14, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.05.013>>

EDAGAWA, A. et al. Isolation and genotyping of potentially pathogenic Acanthamoeba and Naegleria species from tap-water sources in Osaka, Japan. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 105, n. 4, p. 1109–1117, 2009.

EDDYANI, M. et al. Occurrence of Free-Living Amoebae in Communities of Low and High Endemicity for Buruli Ulcer in Southern Benin □. [s. l.], v. 74, n. 21, p. 6547–6553, 2008.

ETCHEBEHERE, A.; SERVILIERI, K.M.; REGAZZI, R.D.; PEDROSO, M.Z.; SARTORELLI, E.M.; CARLOS, A.L.; NABESHIMA, M.A.; CARDOSO, M.M.; NUNES, N. R. . D. T. A metrologia participa do controle de infecções hospitalares cuidando da qualidade do Ar. **METROSAÚDE- Simpósio de Metrologia na área da Saúde**, [s. l.], p. 1–6, 2005.

EVSTIGNEEVA, A. et al. Amoeba co-culture of soil specimens recovered 33 different bacteria, including four new species and Streptococcus pneumoniae. **Microbiology**, England, v. 155, n. 2, p. 657–664, 2009. Disponível em: <<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.022970-0>>

FOUQUE, E. et al. Experimental Parasitology Encystment of Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis: Effects of environmental conditions and cell concentration. **EXPERIMENTAL PARASITOLOGY**, [s. l.], v. 33, p. 1–7, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.03.029>>

GARCIA, A. et al. Identification of Free-Living Amoebae and Amoeba-Associated Bacteria from Reservoirs and Water Treatment Plants by Molecular Techniques. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 47, n. 7, p. 3132–3140, 2013. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/es400160k>>

GEISEN, S. et al. Acanthamoeba everywhere: high diversity of Acanthamoeba in

soils. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 113, n. 9, p. 3151–3158, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-014-3976-8>>

GRACE, E.; ASBILL, S.; VIRGA, K. Naegleria fowleri: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment Options. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 59, n. 11, p. 6677–6681, 2015. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01293-15>>

GREUB, G.; RAOULT, D. Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 413–433, 2004. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.17.2.413-433.2004>>

HOGARDT, M. et al. Specific and rapid detection by fluorescent in situ hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 818–825, 2000.

IOVIENO, A. et al. Detection of Bacterial Endosymbionts in Clinical Acanthamoeba Isolates. **Ophthalmology**, [s. l.], v. 117, n. 3, p. 445–452.e3, 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161642009009580>>

JAHN, C. et al. Caracterização dos Genes de metalo-beta-lactamase blaNDM, blaSPM e blaIMP em Pseudomonas aeruginosa Resistentes a Carbapenems. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, [s. l.], v. 6, p. 165–177, 2017. Disponível em: <<https://online.unisc.br/seer/index.php/epidemiologia/article/view/8292>>

JAROLIM, K. L. et al. A light microscopy study of the migration of Naegleria fowleri from the nasal submucosa to the central nervous system during the early stage of primary amebic meningoencephalitis in mice. **The Journal of parasitology**, [s. l.], v. 86, n. 1, p. 50–5, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10701563>>

KAO, P. et al. Diversity and Seasonal Impact of Acanthamoeba Species in a Subtropical Rivershed. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2013, p. 1–8, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/405794/>>

KAO, P. et al. Acta Tropica Identification and quantification of the Acanthamoeba species and genotypes from reservoirs in Taiwan by molecular techniques. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 132, p. 45–50, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.12.020>>

KARGER, A. E. Separation of DNA sequencing fragments using an automated capillary electrophoresis instrument. **Electrophoresis**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 144–151, 1996. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/elps.1150170124>>

KEBBI-BEGHDADI, C.; GREUB, G. Importance of amoebae as a tool to isolate amoeba-resisting microorganisms and for their ecology and evolution: The Chlamydia paradigm. **Environmental Microbiology Reports**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 309–324, 2014.

KHAN, N. A. Acanthamoeba : biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 564–595, 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x>>

KHAN, N. A.; JARROLL, E. L.; PAGET, T. A. Acanthamoeba can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 204–208, 2001.

KHAN, N.; SIDDIQUI, R. Balamuthia mandrillaris: Morphology, biology, and virulence. **Tropical Parasitology**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 15, 2015. Disponível em: <<http://www.tropicalparasitology.org/text.asp?2015/5/1/15/149888>>

KHURANA, S. et al. Free living amoebae in water sources of critical units in a tertiary care hospital in India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Department of Medical Parasitology, Postgraduate Institute of Medical Education and Research, Chandigarh, India., India, v. 33, v. 2015/06/13, n. 3, p. 343–348, 2015. Disponível em: <<http://www.ijmm.org/text.asp?2015/33/3/343/158543>>

KOCAZEYBEK, B. Free living amoebae: Acanthamoeba species pose a great risk for human health. **Indian journal of medical microbiology**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 349–50, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26068333>>

KRUMMENAUER, E. C. et al. Resistência x Resistência. **Revista da AMRIGS**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 122–123, 2010.

KUIPER, M. W. et al. Quantitative Detection of the Free-Living Amoeba

Hartmannella vermiformis in Surface Water by Using Real-Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 72, n. 9, p. 5750–5756, 2006. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.00085-06>>

LASJERDI, Z. et al. Potentially pathogenic free-living amoebae isolated from hospital wards with immunodeficient patients in Tehran, Iran. **Parasitology Research**, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran., Germany, v. 109, n. 3, p. 575–580, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-011-2288-5>>

LASJERDI, Z. et al. Ophthalmology hospital wards contamination to pathogenic free living Amoebae in Iran. **Acta Parasitologica**, Poland, v. 60, n. 3, p. 417–422, 2015. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/j/ap.2015.60.issue-3/ap-2015-0057/ap-2015-0057.xml>>

LEDEE, D. R. et al. Molecular Identification of T4 and T5 Genotypes in Isolates from Acanthamoeba Keratitis Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 47, n. 5, p. 1458–1462, 2009. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.02365-08>>

LEUNG, M.; CHAN, A. H. S. Control and management of hospital indoor air quality. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. SR17-23, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16501436>>

LIANG, S.-Y. et al. Isolation and identification of Acanthamoeba species related to amoebic encephalitis and nonpathogenic free-living amoeba species from the rice field. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 109, n. 4, p. 1422–1429, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2010.04779.x>>

LIM, N. et al. Comparison of Polyhexamethylene Biguanide and Chlorhexidine as Monotherapy Agents in the Treatment of. [s. l.], 2008.

LORENZO-MORALES, J. et al. Pathogenic Acanthamoeba strains from water sources in Jamaica, West Indies. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, [s. l.], v. 99, n. 8, p. 751–758, 2005. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/136485905X65215>>

LORENZO-MORALES, J.; KHAN, N. A.; WALOCHNIK, J. An update on Acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite**, [s. l.], v. 22, p. 10, 2015. Disponível em: <<http://www.parasite-journal.org/10.1051/parasite/2015010>>

MAGHSOOD, A. H. Acanthamoeba genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 54, n. 8, p. 755–759, 2005. Disponível em: <<http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.45970-0>>

MAGNET, A. et al. A year long study of the presence of free living amoeba in Spain. **Water Research**, [s. l.], v. 47, n. 19, p. 6966–6972, 2013.

MAJID, M. A. A. et al. Pathogenic waterborne free-living amoebae: An update from selected Southeast Asian countries. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 1–17, 2017.

MANZ, W. et al. Phylogenetic Oligodeoxynucleotide Probes for the Major Subclasses of Proteobacteria: Problems and Solutions. **Systematic and Applied Microbiology**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 593–600, 1992. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80121-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80121-9)>

MARCIANO-CABRAL, F. et al. Identification of Naegleria fowleri in Domestic Water Sources by Nested PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 69, n. 10, p. 5864–5869, 2003.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. Acanthamoeba spp. as Agents of Disease in Humans. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 273–307, 2003. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/content/16/2/273>>

MARTÍN-NAVARRO, C. M. et al. The potential pathogenicity of chlorhexidine-sensitive Acanthamoeba strains isolated from contact lens cases from asymptomatic individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 57, n. 11, p. 1399–1404, 2008.

MASCHIO, V. J.; CORÇÃO, G.; ROTT, M. B. Identification of pseudomonas spp.

as amoeba-resistant microorganisms in isolates of acanthamoeba. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 81–83, 2015.

MICHEL, R.; BURGHARDT, H.; BERGMANN, H. Acanthamoeba, naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital. **Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin = International journal of hygiene and environmental medicine**, Ernst-Rodenwaldt-Institut, Koblenz., Germany, v. 196, v. 1995/03/01, n. 6, p. 532–44, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7619202>>

MIYAKE, M.; FUKUI, T.; IMAI, Y. Differences in protein synthesis between wild type and intracellular growth-deficient strains of *Legionella pneumophila* in U937 and *Acanthamoeba polyphaga*. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 161–170, 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401006000027>>

MIYAMOTO, H. et al. Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of *Legionellae* in hospital cooling tower water. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 63, n. 7, p. 2489–2494, 1997.

MOTER, A.; GÖBEL, U. B. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 85–112, 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701200001524>>

MUCHESA, P.; BARNARD, T. G.; BARTIE, C. The prevalence of free-living amoebae in a South African hospital water distribution system. **South African Journal of Science**, [s. l.], v. 111, n. 1–2, p. 3–5, 2015. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84921888151&doi=10.17159%2Fsaajs.2015%2F20140278&partnerID=40&md5=b3edaf20e4066c3a1ee51ac86c28da30>>

NAGYOVÁ, V.; NAGY, A.; TIMKO, J. Morphological, physiological and molecular biological characterisation of isolates from first cases of *Acanthamoeba keratitis* in Slovakia. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 106, n. 4, p. 861–872, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-010-1731-3>>

NBR7256. Norma Brasileira - Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)2005.

NEFF, R. J.; NEFF, R. H. The biochemistry of amoebic encystment. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, [s. l.], v. 23, p. 51–81, 1969. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4243920>>

NIYYATI, M. et al. Isolation of *Balamuthia mandrillaris* from urban dust, free of known infectious involvement. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 106, n. 1, p. 279–281, 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-009-1592-9>>

NIYYATI, M. et al. Occurrence of Free-living Amoebae in Nasal Swabs of Patients of Intensive Care Unit (ICU) and Critical Care Unit (CCU) and Their Surrounding Environments. **Iranian journal of public health**, Iran, v. 47, n. 6, p. 908–913, 2018.

NIYYATI, M.; REZAEIAN, M. Current status of *Acanthamoeba* in Iran: A narrative review article. **Iranian Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 157–163, 2015.

ODDÓ B, D.; CIANI A, S.; VIAL C, P. Encefalitis amebiana granulomatosa por *Balamuthia mandrillaris*: Primer caso diagnosticado en Chile. **Revista chilena de infectología**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 232–236, 2009.

OOI, S. S. et al. The correlation of *Acanthamoeba* from the ventilation system with other environmental parameters in commercial buildings as possible indicator for indoor air quality. **INDUSTRIAL HEALTH**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 35–45, 2016.

OVRUTSKY, A. R. et al. Cooccurrence of Free-Living Amoebae and Nontuberculous Mycobacteria in Hospital Water Networks, and Preferential Growth of *Mycobacterium avium* in *Acanthamoeba lenticulata*. **Applied and Environmental Microbiology**, National Jewish Health, Denver, CO, USA., United States, v. 79, v. 2013/03/12, n. 10, p. 3185–3192, 2013. Disponível em: <<http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.03823-12>>

PAGE, F. C. **A new key to freshwater and soil gymnamoebae: with**

instructions for culture. Cumbria, UK: Freshwater Biological Association Scientific Publications, 1988.

PANDA, A. et al. Prevalence of naegleria fowleri in environmental samples from northern part of India. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 1–14, 2015.

PÉLANDAKIS, M.; SERRE, S.; PERNIN, P. Analysis of the 5.8S rRNA gene and the internal transcribed spacers in Naegleria spp. and in N. fowleri. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 116–121, 2000.

PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 362, n. 19, p. 1804–1813, 2010.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463340>><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3107499>>

PUSSARD, R. PONS, R. M.-P. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre Acanthamoeba (Protozoa: Amoebida). **Protistologica**, [s. l.], v. 13, p. 557–598, 1977.

QVARNSTROM, Y. et al. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, and Naegleria fowleri. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 44, n. 10, p. 3589–3595, 2006.

RAHDAR, M. et al. Isolation and genotyping of acanthamoeba strains from environmental sources in ahvaz city, khuzestan province, southern iran. **Iranian journal of parasitology**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 22–6, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23323088>>

RENNER, J. D. P.; CARVALHO, É. D. MICRORGANISMOS ISOLADOS DE SUPERFÍCIES DA UTI ADULTA EM UM HOSPITAL DO VALE DO RIO PARDO – RS. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 40, 2013. Disponível em: <<http://online.unisc.br/seer/index.php/epidemiologia/article/view/3290>>

RETANA-MOREIRA, L. et al. Isolation and molecular characterization of Acanthamoeba and Balamuthia mandrillaris from combination shower units in Costa Rica. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 113, n. 11, p. 4117–4122, 2014.

REYES-BATLLE, M. et al. Acanthamoeba genotypes T2 , T4 , and T11 in soil sources from El Hierro island , Canary Islands , Spain. **Parasitology Research**, [s. l.], p. 3–6, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5048-8>>

RIVIÈRE, D. et al. Development of a real-time PCR assay for quantification of Acanthamoeba trophozoites and cysts. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 78–83, 2006.

ROHR, U. et al. Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. **Applied and environmental microbiology**, Institut fur Hygiene und Mikrobiologie, Ruhr-Universität Bochum, Germany. rohr@hygiene.ruhr-uni-bochum.de, United States, v. 64, v. 1998/05/09, n. 5, p. 1822–1824, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9572957>>

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci**, [s. l.], v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

SCHEIKL, U. et al. Free-living amoebae and their associated bacteria in Austrian cooling towers: a 1-year routine screening. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 115, n. 9, p. 3365–3374, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-5097-z>>

SCHMITZ-ESSER, S. et al. Diversity of bacterial endosymbionts of environmental Acanthamoeba isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 74, n. 18, p. 5822–5831, 2008.

SCHROEDER, J. M. et al. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. **Journal of clinical microbiology**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 1903–11, 2001. Disponível em: <<https://insights.ovid.com/crossref?an=00003081-198703000-00012>>

SCHUNDER, E. et al. Phospholipase PlaB is a new virulence factor of Legionella pneumophila. **International Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 300, n. 5, p. 313–323,

2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.01.002>>

SENTE, C. et al. Prevalence of pathogenic free-living amoeba and other protozoa in natural and communal piped tap water from Queen Elizabeth protected area, Uganda. **Infectious Diseases of Poverty**, [s. l.], p. 1–14, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s40249-016-0162-5>>

SIDDIQUI, R.; DUDLEY, R.; KHAN, N. A. Acanthamoeba differentiation: A two-faced drama of Dr Jekyll and Mr Hyde. **Parasitology**, [s. l.], v. 139, n. 7, p. 826–834, 2012.

SIDDIQUI, R.; JARROLL, E. L.; KHAN, N. A. Balamuthia mandrillaris: Role of galactose in encystment and identification of potential inhibitory targets. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 126, n. 1, p. 22–27, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.09.013>>

SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Photochemotherapeutic strategies against Acanthamoeba keratitis. **AMB Express**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 1, 2012. Disponível em: <AMB Express>

SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Primary Amoebic Meningoencephalitis Caused by Naegleria fowleri: An Old Enemy Presenting New Challenges. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. e3017, 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003017>>

SPANAKOS, G. et al. Genotyping of pathogenic Acanthamoebae isolated from clinical samples in Greece-Report of a clinical isolate presenting T5 genotype. **Parasitology International**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 147–149, 2006.

SPIPKER, T. et al. PCR-based assay for differentiation of Pseudomonas aeruginosa from other Pseudomonas species recovered from cystic fibrosis patients. **Journal of clinical microbiology**, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 2074–9, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15131172>>

STOTHARD, D. R. et al. The evolutionary history of the genus Acanthamoeba and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 45–54, 1998.

TASHIRO, Y.; UCHIYAMA, H.; NOMURA, N. Multifunctional membrane vesicles in Pseudomonas aeruginosa. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 1349–1362, 2012.

TEIXEIRA, L. H. et al. Prevalence of potentially pathogenic free-living amoebae from Acanthamoeba and Naegleria genera in non-hospital, public, internal environments from the city of Santos, Brazil. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, Catholic University of Santos, Santos, SP, Brazil, Brazil, v. 13, v. 2010/05/14, n. 6, p. 395–397, 2009. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-77953936798&partnerID=40&md5=3d8740461f2950cf047b739e919f077b>>

THOMAS, V. et al. Biodiversity of Amoebae and Amoeba-Resisting Bacteria in a Hospital Water Network. **Applied and environmental microbiology**, United States, v. 72, n. 4, p. 2428–2438, 2006. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.72.4.2428-2438.2006>>

THOMAS, V. et al. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 231–259, 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2009.00190.x>>

TODD, C. D. et al. Isolation and Genotyping of Acanthamoeba Strains from Soil Sources from Jamaica, West Indies. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 416–421, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jeu.12197>>

TRABELSI, H. et al. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. **Pathologie Biologie**, [s. l.], v. 60, n. 6, p. 399–405, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.patbio.2012.03.002>>

TRABELSI, H. et al. Morphological and molecular identification of free living amoeba isolated from hospital water in Tunisia. **Parasitology Research**, Fungal and parasitic molecular biology laboratory- Sfax, School of Medicine, Sfax University, 3029, Sfax, Tunisie.

Thouaida@yahoo.fr. Fungal and parasitic molecular biology laboratory- Sfax, School of Medicine, Sfax University, 3029, Sfax, Tunisie., Germany, v. 115, v. 2015/10/16, n. 1, p. 431–435, 2015. Disponible em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-015-4788-1>>

TRABELSI, H. et al. Morphological and molecular identification of free living amoeba isolated from hospital water in Tunisia. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 115, n. 1, p. 431–435, 2016. Disponible em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-015-4788-1>>

VILLAJOS, J.R.O.; SIMÓ, B. Notas sobre la ecología de Legionella: “El caballo de Troya”. **Profesión Veterinaria**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 54–59, 2008. Disponible em: <<http://europa.sim.ucm.es/compludoc/AA?articuloid=617880>>

VISVESVARA, G. S. et al. Paravahlkampfia francinae n. sp. Masquerading as an Agent of Primary Amoebic Meningoencephalitis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 357–366, 2009. Disponible em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1550-7408.2009.00410.x>>

VISVESVARA, G. S. Infections with free-living amoebae. In: **Handbook of clinical neurology**. [s.l.] : Elsevier, 2013. p. 153–168.

VISVESVARA, G. S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris , Naegleria fowleri , and Sappinia diploidea. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 1–26, 2007. a. Disponible em: <<https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x>>

VISVESVARA, G. S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris , Naegleria fowleri , and Sappinia diploidea. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 1–26, 2007. b. Disponible em: <<https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x>>

WALIA, R. et al. A case of successful treatment of cutaneous Acanthamoeba infection in a lung transplant recipient. **Transplant Infectious Disease**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 51–54, 2007.

WALOCHNIK, J.; SCHEIKL, U.; HALLER-SCHÖBER, E.-M. Twenty Years of Acanthamoeba Diagnostics in Austria. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 3–11, 2015. Disponible em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jeu.12149>>

WALOCHNIK, J.; WYLEZICH, C.; MICHEL, R. The genus Sappinia: History, phylogeny and medical relevance. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 126, n. 1, p. 4–13, 2010. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.11.017>>

WATSON, P. M.; SORRELL, S. C.; BROWN, M. W. Ptolemeba n. gen., a Novel Genus of Hartmannellid Amoebae (Tubulinea, Amoebozoa); with an Emphasis on the Taxonomy of Saccamoeba. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s. l.], v. 61, n. 6, p. 611–619, 2014. Disponible em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jeu.12139>>

ZHANG, Y. et al. Identification of 18S Ribosomal DNA Genotype of Acanthamoeba from Patients with Keratitis in North China. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 1904, 2004. Disponible em: <<http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.03-1073>>

10. ANEXOS



Santa Cruz do Sul, 07 de abril de 2016

Prezados Senhores

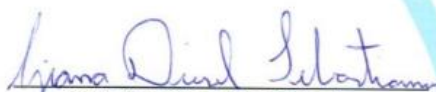
Declaramos para os devidos fins, conhecer o protocolo de pesquisa intitulado **“DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS MOLECULARES NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS E DE GENES ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA”**, desenvolvido pela Profª do Mestrado de Promoção em saúde, **Jane Dagmar Pollo Renner**, bem como os objetivos e a metodologia do estudo proposto. Salientamos que publicações acerca dos dados obtidos no referido estudo devem ser previamente submetidos à análise da Instituição.

Afirmamos concordar com o parecer ético consubstanciado que será emitido pelo CEP da instituição proponente, conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/12. Esta instituição está ciente de suas co-responsabilidades como instituição co-participante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados.

Atenciosamente,


Eliane Krummenauer
Enfermeira
COREN Nº 77622

Enf. Eliane Carlosso Krummenauer
Coordenadora do CCIH / HSC


Prof. Dr. Giana Diesel Sebastiany
Diretora de Ensino, Pesquisa e Extensão / HSC

ASSOCIAÇÃO PRÓ-ENSINO EM SANTA CRUZ DO SUL - APESC

Rua Fernando Abott, 174 - 96.810-072 - Santa Cruz do Sul - RS - Fone/Fax: (51) 3713-7400 - www.hospitalstacruz.com.br - hsc@unisc.br