

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE AMEBAS DE VIDA
LIVRE POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS EM
AMOSTRAS DE AMBIENTES DO HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE-RS**

Dissertação de Mestrado

Ana Maris Carlesso

Porto Alegre, 2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E
DO AMBIENTE**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE AMEBAS DE VIDA LIVRE
POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS EM AMOSTRAS DE AMBIENTES DO
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE-RS**

Ana Maris Carlesso
Farmacêutica-Bioquímica (UFSM)

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

Porto Alegre (RS), Brasil
Abril de 2006

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

À Professora Marilise B. Rott, pela orientação, apoio, estímulo, compreensão e amizade durante a realização deste trabalho.

À Georgia Lazzari Artuso pela imensa colaboração neste trabalho, em que esteve presente desde o início até o fim, principalmente pela amizade.

Ao professor Amauri B. Simonetti pela orientação.

Ao professor Jeffrey D. Cirillo, da Universidade de Stanford, na Califórnia – EUA, pela colaboração com a doação da cepa padrão possibilitando a realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pelo apoio financeiro.

À direção do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), por possibilitar a realização deste trabalho. A todos os setores deste hospital, que, de alguma forma, colaboraram na realização deste trabalho.

A todos os professores e técnicos do Setor de Parasitologia do ICBS, onde este trabalho foi realizado, que sempre ajudaram quando solicitados.

À Roberta Reis pela colaboração, incentivo e apoio neste trabalho.

À Viviana Matesco pela ajuda e apoio neste trabalho.

A minha mãe pela compreensão nas minhas ausências. Aos meus irmãos Vera e Roberto pelo apoio e incentivo para realizar este trabalho e ao meu pai e meu irmão Carlos Renato, que onde estiverem estarão olhando por mim.

A todos os meus colegas deste mestrado, pela amizade e apoio durante essa jornada.

A professora Maria Lúcia Scroferneker pelo empréstimo do laboratório.

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE AMEBAS DE VIDA LIVRE POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS EM AMOSTRAS DE AMBIENTES DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE-RS¹

Autor: Ana Maris Carlesso
Orientador: Prof. Dr. Amauri Braga Simonetti
Co-orientador: Prof. Dra. Marilise Brittes Rott

RESUMO

Amebas de vida livre (AVL), tais como *Acanthamoeba* spp., *Naegleria* spp. e *Balamuthia mandrillaris*, são potenciais agentes de infecções humanas podendo ser encontradas no meio ambiente como solo, água fresca e ar atmosférico. No Brasil, de um modo geral, há poucos trabalhos relatando a importância do estudo desses patógenos em ambientes hospitalares. Assim este trabalho visou estudar a presença de *Acanthamoeba* spp. e *Naegleria* spp. na poeira e biofilmes de 15 ambientes diferentes (CTI, UTI pediátrica, Centro Cirúrgico, Centro Cirúrgico Ambulatorial, Emergência, Cozinha, Reservatórios de Azulejo e de Concreto, 06 Bebedouros e 01 Torneira) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS (HCPA). Coletas mensais de poeira e biofilmes foram realizadas com suabes passados aleatoriamente nos locais de coleta, de julho de 2004 e março de 2005, totalizando 135 amostras. Após sedimentação do material, o sedimento foi usado como inóculo em placas de Petri com ágar não nutriente 1,5%, previamente inoculadas com *E. coli*. As amostras foram incubadas durante 10 dias a 30°C. Das 135 amostras coletadas dos 15 ambientes do HCPA, 47 (35%) foram positivas para AVL, segundo critérios morfológicos de Page. Destas, 34% apresentaram características morfológicas próprias do gênero *Acanthamoeba*, sendo 03 desses isolados confirmados por PCR.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (75p.) – Abril, 2006.

POTENTIALLY PATHOGENIC FREE-LIVING AMOEBAE ISOLATION AND IDENTIFICATION IN SAMPLES FROM A PUBLIC HOSPITAL IN THE CITY OF PORTO ALEGRE-BRAZIL¹

Author: Ana Maris Carlesso
Supervisor: Prof. Amauri Braga Simonetti
Co-Supervisor: Prof. Marilise Brittes Rott

ABSTRACT

Free-living Amoebae (FLA), as *Acanthamoeba* spp., *Naegleria* spp., and *Balamuthia mandrillaris*, are potentially agents of human infections and they can be found in the environment like soil, fresh water and atmosphere. In Brazil, investigations of these pathogens in the hospital environment are rarely related. Therefore, the aim of this study is to investigate the *Acanthamoeba* spp. and *Naegleria* spp. presence in the dusty and biofilms from several places (CTI, pediatrics UTI, surgical center, clinic surgical center, emergency, kitchen, concrete reservoir, wall tile reservoir, 06 drinking place and 01 tap) in the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. One hundred and thirty five samples were collected with swabs from July 2004 to March 2005, in a randomly way. The samples were sedimented and transferred to non-nutrient agar 1.5%, previously inoculated with *Escherichia coli*. The samples were incubated during 10 days at 30°C. From the 135 samples in 15 places, 47 (35%) were positive for FLA, identified through morphologic characters, according to Page key. 34% of these showed peculiarity of genus *Acanthamoeba*, with 03 isolated confirmed by PCR.

¹ Masters Dissertation in Agriculture and Environmental Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (p. 75), April, 2006.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. Histórico.....	16
2.2. Aspectos morfológicos, biológicos e epidemiológicos	18
2.2.1. Isolamento das AVL	19
2.2.2. Taxonomia das AVL.....	20
2.2.3. AVL em biofilmes.....	9
2.2.4. <i>Acanthamoeba</i> spp.....	10
2.2.5. <i>Naegleria fowleri</i>	12
2.2.6. <i>Balamuthia mandrillaris</i>	25
2.2.7. <i>Sappinia diploidea</i>	26
2.3. Doenças causadas por amebas de vida livre	27
2.3.1. Encefalite amebiana granulomatosa	27
2.3.2. Ceratite crônica	29
2.3.3. Meningoencefalite amebiana primaria	31
2.4. Identificação do gênero <i>Acanthamoeba</i> spp.....	33
2.5. Identificação de <i>N. fowleri</i>	36
2.6. Identificação de <i>Balamuthia mandrillaris</i> e <i>Sappinia diploidea</i>	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1. Locais de coleta.....	37
3.2. Amostragem.....	26
3.3. Processamento das amostras.....	29
3.4. Isolamento e identificação das amebas de vida livre (AVL).....	42
3.4.1. Cepas controle	42
3.4.2. Cultura Monoxênica.....	30
3.4.3. Cultura Axênica.....	43
3.4.4. Criopreservação das cepas axenizadas	43
3.4.5. Exflagelação dos organismos	44
3.4.6. Tolerância à temperatura	44
3.4.7. Preparo das Lâminas e Coloração.....	45
3.4.8. Estudo das características morfológicas das AVL	45
3.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	46
3.5.1. Amostras.....	46

3.5.2. Extração de DNA	47
3.5.2.1. Extração através de choque térmico	47
3.5.2.2. Extração com tampão de lise	47
3.5.2.3. Extração com fenol.	48
3.5.3. Oligonucleotídeos utilizados e suas seqüências	48
3.5.4. Condições de amplificação da seqüência alvo do gene ssu rDNA por PCR	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1. Isolamento das Amebas de Vida Livre (AVL)	50
4.2. Resultado segundo a época do ano.....	51
4.3. Resultado de acordo com o tipo de material coletado	53
4.4. Resultado por ambiente selecionado	54
4.5. Identificação do gênero <i>Naegleria</i>	58
4.6. Tolerância à temperatura.....	59
4.7. Isolamento e identificação do gênero <i>Acanthamoeba</i>	63
4.7.1. Características morfológicas das AVL potencialmente patogênicas pertencentes ao gênero <i>Acanthamoeba</i>	65
4.8. Reação em cadeia da polimerase das cepas axenizadas do gênero <i>Acanthamoeba</i>	69
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
7. ANEXOS.....	81

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Número de sub-amostras (suabes) coletadas nos 15 ambientes hospitalares entre julho/04 e março/05.....	28
2. Número e percentual de amostras positivas para AVL em diferentes ambientes hospitalares, no período de julho/04 e março/05.....	43
3. AVL isoladas das amostras de poeira e biofilme que cresceram a 37 ⁰ C e a 45 ⁰ C.....	48
4. Amebas de vida livre potencialmente patogênicas do gênero <i>Acanthamoeba</i> , isoladas de amostras de poeira e biofilme, coletadas no período julho de 2004 a março de 2005, no HCPA.....	52
5. Número de amostras positivas para <i>Acanthamoeba</i> por ambiente e percentuais em relação ao total de amostras coletadas e em relação ao total de amostras positivas.....	52
6. Características de trofozoítos e cistos de AVL potencialmente patogênicas pertencentes ao gênero <i>Acanthamoeba</i>	54

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Coleta das amostras no Centro de Terapia Intensiva do HCPA.....	27
2. Coleta das amostras no Reservatório de Concreto do HCPA.....	27
3. Coleta das amostras na UTI Pediátrica do HCPA.....	27
4. Coleta das amostras na Cozinha do HCPA.....	27
5. Coleta das amostras no Bebedouro do HCPA.....	27
6. Coleta das amostras no Reservatório de Azulejo do HCPA.....	27
7. Coleta das amostras no Centro Cirúrgico do HCPA.....	27
8. Esquema do processamento das amostras coletas no HCPA.....	29
9. Distribuição mensal do número de amostras positivas para AVL coletadas no ambiente hospitalar no período julho de 2004 a março de 2005 e as médias das temperaturas mensais.....	40
10. Percentual de positividade para AVL nos ambientes hospitalares em relação ao total de isolados.....	45
11. Cistos e trofozoítos sugestivos de <i>Acanthamoeba</i> spp. em ágar não-nutriente.....	55
12. Cistos e trofozoítos sugestivos de <i>Acanthamoeba</i> spp. em ágar não-nutriente.....	55
13. Cistos e trofozoítos sugestivos de <i>Acanthamoeba</i> spp. em ágar não-nutriente.....	55
14. Cisto sugestivo de <i>Acanthamoeba</i> spp. corado pelo Tricrômico.....	55
15. Cistos sugestivos de <i>Acanthamoeba</i> spp. corados pelo Tricrômico.....	55
16. Cistos sugestivos de <i>Acanthamoeba</i> spp. corados pelo Tricrômico.....	55
17. Trofozoítos sugestivos de <i>Acanthamoeba</i> spp. corados pelo Tricrômico.....	55

18. Trofozoíto sugestivo de <i>Acanthamoeba</i> spp. corado pelo Tricrômico.....	55
19. Trofozoítos do isolado CZ4 em meio PYG.....	56
20. Trofozoíto do isolado RA9 em meio PYG.....	56
21. Cisto do isolado B147 em meio PYG.....	56
22. Cisto com endocisto em forma de estrela de <i>Acanthamoeba</i> spp. (Page, 1988).....	56
23. Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> spp. apresentando acantopódios e vacúolos contráteis (Page, 1988).....	56
24. Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> spp. apresentando acantopódios e vacúolos contráteis (Page, 1988).....	56
25. Produtos da PCR dos isolados axenizados CZ4, RA9 e B147 de <i>Acanthamoeba</i> spp., usando os oligonucleotídeos de Nelson.....	59

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%=	Percentual
°C=	graus Celsius
®=	Marca registrada
™=	trade mark
(-)=	Negativo
µm=	Micrômetro
µL=	Microlitro
µL/mL=	microlitro por mililitro
µg/mL=	micrograma por mililitro
µmol=	Micromoles
AIDS=	síndrome da imunodeficiência adquirida
ATCC=	American Type Culture Collection
AVL=	amebas de vida livre
cm ³ =	centímetro cúbico
CO ₂ =	dióxido de carbono
dATP=	desoxiadenosina trifosfatada
dCTP=	desoxicitosina trifosfatada
dGTP=	desoxiguanosina trifosfatada
dTTP=	desoxitimina trifosfatada
DNA=	ácido desoxirribonucléico
DMSO=	Dimetilsulfóxido
et al.=	et alii (e colaboradores)
EUA=	Estados Unidos da América
EAG=	Encefalite Amebiana Granulomatosa
h=	Hora
HCPA=	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
ICBS=	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Krpm=	mil rotações por minuto
MAP=	Meningoencefalite Amebiana Primária
min=	Minuto
mg=	Miligrama
mL=	Mililitro
mm=	Milímetro
mM=	Milimolar
mMol=	Milimoles
M=	Molar
Nº=	Número
NaOH=	hidróxido de sódio
ng=	Nanograma
pb=	pares de base
PBS=	tampão de sal fosfato
PCR=	Reação em Cadeia da Polimerase
pH=	potencial hidrogeniônico
POP=	Procedimento Operacional Padrão

PYG=	meio proteose-peptona – extrato de levedo – glicose
qsp=	quantidade suficiente para
RAPD=	Polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente
rDNA=	ácido desoxirribonucléico ribossomal
RFLP=	Polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição
RNA=	Ácido ribonucléico
RS=	Rio Grande do Sul
spp.=	Espécies
ssu=	Subunidade menor
TE=	Tris-EDTA
TSA=	água de soja-tripticase
U=	Unidade
UFRGS=	Universidade federal do Rio Grande do Sul
V/V=	volume por volume

1. INTRODUÇÃO

Infecções causadas por amebas de vida livre (AVL) não são, em geral, muito bem conhecidas ou reconhecidas clinicamente. As AVL, que esporadicamente parasitam o homem, são protozoários com ampla dispersão ambiental, isoladas em lagos, rios, piscinas, solos, esgotos e cursos de água que recebem efluentes industriais, estando presente em todos os continentes e climas. Também são encontrados em água para consumo humano, descargas termais, equipamentos lava-olhos, encanamentos de equipo odontológico e unidades de hemodiálise.

As três principais AVL potencialmente patogênicas para o homem e animais são: *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp. e *Balamuthia mandrillaris*, as quais têm sido relacionadas com meningoencefalites, ulcerações da pele e infecções da córnea. Os casos diagnosticados apontam para índices de morbidade e mortalidade que crescem a cada dia. Casos de Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) têm sido documentados em pacientes aidéticos ao redor do mundo. A ceratite por *Acanthamoeba* ocorre principalmente em usuários de lentes de contato e embora dados recentes indiquem que possa estar associada com outras condições predisponentes, tem se mostrado como um crescente problema no campo da oftalmologia, tendo sido diagnosticada como patógeno da superfície ocular pela primeira vez em 1973. O diagnóstico desta ameba na superfície ocular é freqüentemente difícil de ser realizado, pois sua apresentação pode mimetizar ceratite herpética ou bacteriana. O atraso no diagnóstico pode ser extremamente prejudicial ao paciente, conduzindo ao agravamento do quadro

podendo culminar até mesmo em enucleação. Assim, o encontro de AVL potencialmente patogênicas em amostras ambientais às quais o ser humano se expõe com frequência, é de grande interesse para conhecer-se os riscos aos quais as pessoas estão expostas.

AVL em ambientes hospitalares se mostram como possíveis fontes de infecções aos seres humanos. Tem sido demonstrada a resistência dos seus cistos a desinfetantes, como o cloro entre outros, dificultando assim a desinfecção de ambientes contaminados. Além disso, as AVL resistem a condições extremas de temperatura e pH. O gênero *Acanthamoeba*, também tem sido implicado como veículo de várias bactérias patogênicas, como por exemplo, a *Legionella* spp., entre outros endossimbiontes.

O presente estudo é pioneiro em Porto Alegre, RS. No Brasil, os poucos trabalhos realizados até o momento são insuficientes para demonstrar a real importância das amebas de vida livre como possíveis agentes patogênicos, principalmente em ambientes hospitalares. Justifica-se, assim execução desse trabalho que objetivou isolar e identificar essas amebas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, avaliando-se a poeira de diversos ambientes hospitalares, além dos biofilmes de reservatórios e bebedouros coletivos, visando possibilitar sua localização e conhecer os riscos para futuramente, realizar estudos para sua eliminação e controle.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico

Amebas de vida livre (AVL), também chamadas límax ou anfitriças, são protozoários amplamente dispersos na natureza e seu envolvimento em patologia humana só foi reconhecido a partir de 1965, quando casos fatais de meningoencefalite foram descritos na Austrália. Primeiramente o microrganismo foi identificado como *Acanthamoeba* e posteriormente esse agente etiológico foi classificado como *Naegleria fowleri*, por Fowler e Carter (Carter, 1968).

Em 1958, ao inocular intranasalmente animais de laboratório com uma vacina contaminada, Culbertson descobriu o potencial patogênico de uma ameba, que até então era considerada saprofítica e não patogênica. Os animais haviam morrido de encefalite e a investigação do agente etiológico revelou a presença de uma ameba como contaminante da vacina. Essa ameba foi identificada como pertencente ao gênero *Acanthamoeba* e faz parte do grupo das AVL (Culbertson et al., 1958). O primeiro caso de encefalite humana por *Acanthamoeba*, foi descrito em 1972 por Janger e Stamm. A infecção foi caracterizada como oportunista e ocorreu em um paciente debilitado. A partir daí, vários outros casos têm sido descritos em diversas partes do mundo, sendo estimados até então cerca de 200 casos de encefalites (Schuster & Visvesvara, 2004b).

O primeiro caso de uma infecção fatal por meningoencefalite causada por *Balamuthia mandrillaris* foi identificado por Visvesvara e colaboradores em 1990, em uma macaca babuína mandril grávida, do

zoológico de San Diego – EUA. O isolamento da ameba no macerado do cérebro desse animal foi conseguido através do cultivo em células de rins de macaco, porque esse organismo não cresce em meios líquidos convencionais, nem em placas de ágar com bactérias (Visvesvara et al., 1990). Em seguida a ameba foi detectada em humanos em um paciente com AIDS, sendo classificada como pertencente à ordem Leptomyxida (Anzil et al., 1991). Em 1993, Visvesvara e colaboradores identificaram a ameba da ordem Leptomyxida como *B. mandrillaris*. Foram descritos pouco mais de 100 casos de encefalite por *B. mandrillaris* no mundo (Schuster & Visvesvara, 2004b). Recentemente por Dunnebacke e colaboradores (2004), *B. mandrillaris* foi isolada pela primeira vez do meio ambiente.

Gelman e colaboradores (2001), relataram o único caso ocorrido até hoje de encefalite causada pela ameba do solo *Sappinia diploidea*, em um homem imunocompetente. O relato sugere que a porta de entrada foi o trato respiratório, pois o paciente tinha contato com animais de fazenda e talvez à exposição aos cistos da ameba carregados pelo ar tenham penetrado através das narinas. Devido à recuperação do paciente, é provável que esta ameba seja menos virulenta do que às três principais AVL potencialmente patogênicas. Entretanto, com o aumento de pessoas imunocomprometidas e debilitadas, existe a possibilidade dessa ameba começar a ser reconhecida como agente oportunista em diversas infecções (Schuster & Visvesvara, 2004b; Schuster, 2002; Gelman et al., 2001).

2.2. Aspectos morfológicos, biológicos e epidemiológicos

As amebas de vida livre já foram isoladas praticamente em todos os ambientes, nas mais diversas altitudes e em todos os continentes. Podem resistir a condições extremas de temperatura e de pH, bem como ao cloro e outros sistemas de desinfecção (Cursons, 1980). Foram isoladas a partir de água doce, águas minerais engarrafadas, água do mar, sedimentos de oceano, água de rede pública de distribuição, piscinas aquecidas e geladas, lagos, rios, solos, ar, aparelhos de ar condicionado, material de diálise, instrumental cirúrgico e lentes de contato. Em seres humanos, foram isoladas de cavidade nasal, faringe, intestino, tecidos infectados, cérebro, pulmão, pele e córnea (Stevens et al., 1977; Sawyer, 1988; Rivera et al., 1993; Gautom et al., 1994; Rohr et al., 1998; Barbeau & Buhler, 2001; Sheehan et al., 2003; Silva & Rosa, 2003; Tsvetkova et al., 2004; Morales et al., 2005).

As amebas de vida livre têm sido descritas como parasitos facultativos ou patógenos oportunistas. Esses organismos não dependem de um hospedeiro para sua transmissão e não ocorre a transmissão de doença amebiana, causada por esses agentes, de hospedeiro para hospedeiro. Amebas de vida livre que podem causar doenças graves em humanos, muitas delas fatais, são: *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia diploidea* e vários outros gêneros que, pela habilidade de sobreviver dentro de um hospedeiro animal, seriam pré-adaptados para um pseudoparasitismo podendo ser potencialmente patogênicos (Schuster & Visvesvara, 2004b).

As formas trofozoíticas das AVL são ativas e alimentam-se de bactérias, exceto *Balamuthia* que se alimenta de outros protozoários. As AVL encontram-se encistadas em ambientes desfavoráveis. O desencistamento ocorre quando os cistos entram em contato com ambientes úmidos, principalmente em presença de *Escherichia coli* e outras bactérias. Os trofozoítos multiplicam-se por divisão binária simples (Schuster, 2002; Schuster & Visvesvara, 2004). Segundo Ferrante (1991), a única forma invasiva para amebas é o trofozoíto. Os cistos não são invasivos, mas são potencialmente infectivos, já que podem se converter para a forma vegetativa rapidamente sob condições apropriadas.

2.2.1 Isolamento das AVL

Espécies dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria* podem ser isoladas com facilidade em placa de ágar não nutriente, cobertas com bactérias, como *Escherichia coli*, em caldos enriquecidos sem adição de bactérias e em cultura de células de mamíferos. As espécies patogênicas, crescendo em cultura de células, exibem um efeito citopático característico (Griffin, 1972; Murakavwa et al., 1995). A espécie *Balamuthia mandrillaris* não cresce em placa com ágar não nutriente. *In vitro*, alimenta-se de outras amebas menores em cultura de tecidos, mas não se alimenta de bactérias. Células de glioma de rato e de rim de macaco são usadas nesse tipo de cultura para isolar *Balamuthia* de amostras clínicas (Schuster, 2002). Schuster & Visvesvara, em 1996, estabeleceram em meio axênico enriquecido, o crescimento de cepas de *B. mandrillaris*.

2.2.2 Taxonomia das AVL

No momento, a taxonomia das AVL é incerta e sujeita a mudanças, esse fato se deve a dados novos, que são resultados de estudos do seqüenciamento do DNA genômico. As AVL são um grupo polifilético que se originaram de diferentes ramos da árvore genealógica dos protozoários. *Acanthamoeba* e *Balamuthia* são filogenicamente próximas entre si, mas distantes da *Naegleria* e da *Sappinia*. A patofisiologia das doenças que elas causam e a imunocompetência dos hospedeiros, também ajudam a distingui-las. Infecções oportunistas por *Acanthamoeba* e *Balamuthia* ocorrem em indivíduos imunocomprometidos e com o advento da epidemia AIDS/HIV aumentaram os casos de acantamebíases e balamutíases. *Acanthamoeba* também causa ceratite amebiana, uma infecção ocular não-oportunística, em indivíduos saudáveis (Schuster & Visvesvara, 2004a).

Como conseqüência da larga distribuição de amebas de vida livre na água, solo, poeira, areia, entre outros locais, especialmente na forma de cistos resistentes, o contato humano com esses organismos é constante, o que explica a extensa prevalência de anticorpos anti-*Acanthamoeba*, anti-*Balamuthia* e anti-*Naegleria* no soro humano (Bottone, 1993, Huang et al., 1999).

2.2.3. AVL em biofilmes

Um biofilme consiste de células imobilizadas em um substrato e freqüentemente estão envolvidas em uma matriz polimérica orgânica de origem microbiana. O biofilme é um acúmulo superficial, não necessariamente uniforme, que pode ser composto de uma fração significativa de substâncias inorgânicas que se associam à matriz biótica (Characklis & Marshall, 1990).

Os biofilmes podem crescer nas mais variadas superfícies, incluindo superfície da água, alimentos, dentes e vários implantes biomédicos. Normalmente a presença de biofilmes conduz a infecções, entretanto, eles podem algumas vezes ser benéfico. Como exemplo, biofilmes podem ser usados para tratamento de água, pois rompem compostos que auxiliam na purificação. Os efeitos negativos incluem problemas, como a infecção de sondas e catéteres (Neu et al., 1992).

Freqüentemente as AVL desenvolvem-se sobre os biofilmes que funcionam como substrato para sua sobrevivência. Infecções oculares por *Acanthamoeba* spp. em ceratite crônica, na maioria dos casos está implicada com o uso de lentes de contato, devido ao fato de que as lentes poderiam conter biofilmes aderidos a elas, com isso ocorrendo a colonização das amebas de vida livre potencialmente patogênicas. Altos níveis de patógenos oportunistas em equipos dentários e de hemodiálise, também são justificados pela presença de biofilmes (Barbeau & Buhler, 2001).

2.2.4 *Acanthamoeba* spp.

Os organismos do gênero *Acanthamoeba*, isolados do ambiente pela primeira vez em 1930, por Castellani, são encontrados sob duas formas: os trofozoítos com tamanho variando entre 25 e 40 μm , que são as formas vegetativas da célula, possuem um único núcleo com um grande cariossoma central rodeado por um halo claro. O citoplasma é abundante e granuloso, possuem vacúolos pulsáteis na periferia da célula que desaparecem temporariamente e reaparecem em um movimento de sístole-diástole, além de vacúolos digestivos que são menores do que os pulsáteis. Possuem um movimento polidirecional através da emissão de um ou dois pseudópodes globosos e hialinos. Os trofozoítos têm uma característica única que são os acantopódios, projeções aciculiformes da membrana celular, cuja função mais provável seja de aderência à célula hospedeira (Page, 1988; Martinez, 1993).

A outra forma que se pode encontrar o organismo são os cistos, que variam de diâmetro entre 15 e 28 μm , são uninucleados e resistem por longos períodos à dessecação, condições extremas de temperatura, pH e produtos químicos diversos. O gênero é facilmente distinguível de outras amebas, devido às formas características dos cistos que possuem duas paredes, o endocisto e o ectocisto, providos de poros chamados ostíolos e um opérculo, que é um ponto determinado do cisto por onde a ameba sai ao desencistar. De forma geral, o ectocisto é esférico, enquanto o endocisto apresenta formas poligonais que dependem do isolado, variando de triangular a estrelado. Os dois envoltórios são separados entre si, mas se unem nos ostíolos (Page, 1988; Giazzi, 1996; Schuster & Visvesvara, 2004b).

Além de ser a ameba mais freqüentemente isolada, estima-se que o gênero *Acanthamoeba* possa ser o protozoário de vida livre mais comum, o que confere ao gênero uma grande importância ecológica, uma vez que as amebas se alimentam de bactérias, fungos, cianobactérias e protozoários. Além disso, *Acanthamoeba* spp. é o hospedeiro natural de diversas bactérias que vivem como endossimbiontes, especialmente da *Legionella pneumophila*, causadora da “doença dos legionários” em humanos. O crescimento ambiental dessa bactéria, na ausência de protozoários, não tem sido documentado. Acredita-se que o protozoário seja o meio primário de proliferação dessas bactérias sob condições naturais. A inter-relação do ecossistema pode modificar a virulência de *Legionella* spp., possivelmente devido ao aumento na expressão dos genes após crescimento desta espécie nas amebas (Cirillo et al., 1994; Molmeret et al., 2005).

Foram observadas, também, várias espécies dessas amebas abrigando, em seus cistos, algumas espécies de bactérias patogênicas como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae*, *Chlamydiales* entre outras (Rohr et al., 1998; Molmeret et al., 2005). Face ao exposto, aumenta ainda mais sua importância tanto ecológica como em saúde pública. Além disso, *Acanthamoeba* é freqüentemente isolada do trato respiratório superior de indivíduos assintomáticos, sugerindo que o contato entre essas amebas e seus hospedeiros potenciais é bastante intenso (Chappell et al., 2001; Schuster e Visvesvara, 2004b).

2.2.5 *Naegleria fowleri*

O ciclo de vida da *Naegleria fowleri* apresenta as formas de trofozoíto, com diâmetros entre 15 e 30 μm , que têm uma locomoção distinta, “tipo-lesma”, emitindo um ou mais pseudópodes. O cisto apresenta a forma circular, ou poligonal com diâmetro que varia de 10 a 17 μm , uninucleado, liso e provido de poros. E também apresenta uma forma flagelar verificada quando o trofozoíto sofre uma transformação morfogenética onde emite flagelos com duração de 30-60 min, com isso se locomovendo mais rapidamente na água. Esse estágio é transitório, a ameba não se alimenta nem se divide durante a fase flagelar. A forma flagelada é uma maneira de dispersão desse organismo na água, seu habitat natural (Schuster & Visvesvara, 2004b).

Naegleria spp. são encontradas no solo e na água, mas não são ubiqüitárias como *Acanthamoeba*. Em geral a *Naegleria* spp. é mais sensível em ambientes de condições extremas de pH e dessecação, pouco resistente ao cloro (Cursons, 1980) e não sobrevive na água do mar. Como *Naegleria fowleri* é termotolerante, com crescimento em até 45°C; sua proliferação aumenta nos meses de verão em águas termais, recreacionais e principalmente em águas estagnadas (Sawyer, 1988; Pernin et al., 1998; Pélandakis et al., 1998; Sheehan et al., 2003).

Salazar (1985), analisando o primeiro caso brasileiro de meningoencefalite amebiana primária (MAP) causado pela *N. fowleri*, comprovado por necrópsia, constatou que a fonte de infecção foi um tanque construído no quintal da casa da paciente. Entre os fatores ligados às condições que poderiam ter favorecido a ocorrência da infecção, o autor

destaca que a paciente morava em rua de terra, onde a circulação de carros levantava nuvens de poeira e que, durante o mês de março, a temperatura no local, freqüentemente ultrapassava os 30°C.

Em 1994, Sadaka e colaboradores, analisando fontes de água na cidade de Alexandria, Egito, identificaram oito espécies de amebas em amostras de água de canais e canos de esgotos: *Naegleria gruberi*, *N. fowleri*, *Acanthamoeba rhyssodes*, *A. glebaculbertsoni*, *A. astronyxis*, *A. palestinensis*, *Vahlkampfia avara* and *V. inornata*. Concomitantemente, foram analisadas amostras nasais de seis crianças saudáveis que viviam próximas aos canais contaminados, das quais foram isoladas *N. gruberi* e *A. rhyssodes*.

2.2.6 *Balamuthia mandrillaris*

O ciclo de vida de *Balamuthia mandrillaris* compreende um estágio de trofozoíto, medindo entre 30 e 120 µm de diâmetro, maior do que *Acanthamoeba* e *Naegleria*. Os cistos têm tripla camada, sendo a externa mais enrugada, desprovidos de poros, com diâmetro de 10 a 30 µm. A morfologia não está bem definida, a forma da ameba é dependente em grande parte do meio e do tempo de cultivo. Os trofozoítos demonstram um alto grau de polimorfismo, algumas vezes arredondado, mas freqüentemente aparece em uma configuração tipo linha estendida (Schuster, 2002; Schuster & Visvesvara, 2004a).

Existe pouco conhecimento sobre a ecologia de *Balamuthia*, devido ao isolamento da ameba do ambiente ser difícil, o crescimento em cultura ser lento e aparecer somente após outros tipos de protozoários terem crescido

(Schuster et al., 2003). Uma cepa isolada de um vaso de flor, na Califórnia – EUA, na casa de uma criança que morreu de EAG, foi o primeiro isolado do ambiente (Dunnebacke et al., 2004). *Balamuthia* tem sido observada em amostras de solo, mas existe uma certa dificuldade para separá-la de contaminantes como fungos e outras amebas do solo (Dunnebacke et al., 2003).

A ameba *Balamuthia mandrillaris* está presente no solo e provavelmente na água. A porta de entrada em humanos é similar à da *Acanthamoeba*: a pele com ranhuras em contato com solo contaminado com subsequente alcance da via hematogênica ou cistos transportados pela corrente de ar entrando pelo trato respiratório, chegando até o sistema nervoso central. A ameba pode também se disseminar por outros órgãos como: rins, glândulas adrenais, pâncreas, tireóide e pulmões. Geralmente não é encontrada no líquido cefalorraquidiano. A doença é crônica e pode se desenvolver por períodos de semanas até dois anos. Casos de encefalites por *Balamuthia* têm sido relatados, com números de 50 nos Estados Unidos, 45 na América do Sul e México, 08 na Austrália, 02 no Japão e 01 na República Tcheca (Schuster, 2004).

2.2.7 *Sappinia diploidea*

A ameba é relativamente grande, trofozoíto com diâmetro entre 45 e 85µm, com fina película que enruga quando a ameba se move emitindo pseudópodes indistintos. Uma característica distintiva do organismo é a presença de dois núcleos compactos e apostos um do outro. O cisto possui

parede fina medindo entre 13 e 37 μm , binucleado e sem poros. Foi detectado em fezes, e como outras amebas isoladas, é caracterizado como coprozóico. Os cistos podem sobreviver à passagem pelo estômago e às propriedades da bile, ao contrário da *Acanthamoeba* e *Naegleria* que são sensíveis ao suco gástrico. A presença da *Sappinia* nas fezes não é indicativo de infecção. A ameba foi isolada do solo, água e fezes de herbívoros (Gelman et al., 2001; Schuster & Visvesvara, 2004b).

2.3. Doenças causadas por amebas de vida livre

2.3.1 Encefalite amebiana granulomatosa (EAG)

Embora já tenham sido encontrados como oportunistas em infecções em uma grande variedade de tecidos, como pele, ouvido, fígado, pâncreas, baço, próstata, tireóide, trato urogenital, úlcera péptica, entre outras, os organismos do gênero *Acanthamoeba* podem ser responsabilizados por apenas dois tipos de patologia em humanos: Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) e ceratite crônica (Ma et al, 1981; Walochinik et al., 2000; Kong et al., 2002; Khan, 2003; Pasricha et al., 2003).

A EAG, em que os agentes etiológicos são várias espécies de ameba do gênero *Acanthamoeba* spp., sendo as mais isoladas: *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. rhyodes* e *A. divionensis* e por outra ameba mas recentemente implicada, a *Balamuthia mandrillaris*; é uma infecção considerada oportunista, pois quase todos os casos relatados até o momento se referem a indivíduos imunologicamente debilitados, especialmente àqueles

que sofreram algum tipo de terapia ou situação imunossupressora, como alcoolismo, gravidez, quimioterapia ou uso de antibióticos de amplo espectro. Mais recentemente, vêm sendo descritos casos de infecção por *Acanthamoeba* spp. e *Balamuthia mandrillaris* em pacientes com AIDS (Huang et al., 1999; Schuster, 2002).

Presumivelmente, a penetração das amebas ocorre pela pele (ulcerações) ou pelo trato respiratório (neuro-epitélio), seguindo então por via sangüínea até o sistema nervoso central. O período de incubação pode variar de semanas a meses e o curso clínico da doença pode ser prolongado, com um quadro subagudo ou crônico. Após esse período, vários sintomas aparecem: dor de cabeça acompanhada de febre, náuseas, vômitos, letargia, mudança da personalidade e demência (Visvesvara et al., 1990). Como o desenvolvimento da doença é fulminante, geralmente diagnóstico correto só é obtido na necropsia, por análise de fluido cerebrospinal ou do próprio tecido cerebral (Silva & Rosa, 2003; Alves, 2001).

Várias substâncias identificadas nas secreções das amebas têm sido relacionadas como possíveis fatores de virulência em *Acanthamoeba* spp., como as enzimas serina e cisteína proteases que têm atividades contra a matriz das proteínas como o colágeno. A serina protease pode ter atividade de proteção para as amebas contra a resposta imune do hospedeiro, atacando e destruindo as imunoglobulinas do hospedeiro. Os trofozoítos dessas amebas podem induzir apoptose nas células alvo. Cepas patogênicas também exibem maior número de acantopódios, provavelmente para melhor se aderir ao epitélio celular, como o epitélio da córnea (Morales et al., 2005).

2.3.2 Ceratite crônica

Acanthamoeba spp. pode levar a infecções dolorosas da córnea, trazendo sérios problemas de visão aos usuários de lentes de contato, especialmente se as lentes são colonizadas por biofilmes de bactérias (Alves, 2001; Martinez & Janitschke, 1985; Simmons, et al,1998). Ceratite crônica é outra doença em que espécies de *Acanthamoeba* estão implicadas. O primeiro caso de ceratite identificado sendo descrito em 1973 e a contaminação estando associada a lesões na córnea. Os relatos de casos de ceratite, por *Acanthamoeba* vêm aumentando significativamente nos últimos anos, paralelamente à popularização do uso de lentes de contato, principalmente hidrofílicas. Apesar disso, 10 a 15% de casos de ceratite por *Acanthamoeba* ocorrem em pessoas que não usaram lentes de contato (Illinworth & Cook, 1998).

Ao contrário da encefalite, a ceratite por *Acanthamoeba* spp. pode ocorrer em indivíduos sem nenhum sinal de comprometimento imunológico. A contaminação ocorre principalmente quando o indivíduo utiliza práticas inadequadas de desinfecção das lentes. Acredita-se que *Acanthamoeba* não tenha a capacidade de invadir a córnea íntegra, havendo a necessidade da presença de uma lesão prévia, o que explicaria a grande correlação entre a doença e o uso de lentes de contato. Em contato com a córnea, o próximo passo para o estabelecimento da infecção é a aderência e penetração dos trofozoítos no epitélio. Foi observado que a aderência é mediada por uma proteína da membrana do trofozoíto, que se liga a manose de glicoproteínas do epitélio da córnea (Ferrante & Bates, 1988; Morales, 2005). Após a

penetração, seguem-se: ulcerações, infiltrado em forma de anel (exceto *Acanthamoeba griffini*, que produz infiltrados puntuais) e inflamações (Ledee et al., 1996).

Ainda não foi determinado o tempo de incubação para o estabelecimento dos primeiros sintomas da ceratite por *Acanthamoeba*. A irritação devida ao trauma inicial pode se confundir com os primeiros sintomas da infecção, mas, em alguns casos mais raros, poderia haver um período de cerca de duas semanas entre o trauma e o aparecimento dos primeiros sintomas (Illingworth & Cook, 1998). Os sintomas mais comuns da ceratite por *Acanthamoeba* são fotofobia, opacidade da córnea, dores intensas (normalmente desproporcionais à gravidade aparente das lesões) e diminuição da visão (Alves, 2001; Illingworth & Cook, 1998, Visvesvara et al., 1990).

Um dos problemas mais sérios e preocupantes nas infecções oculares por *Acanthamoeba* é a deficiência de um diagnóstico rápido e correto. Na maioria dos casos, o diagnóstico efetuado refere-se à presença de herpes, fungos e bactérias. A presença da ameba muitas vezes só é detectada através de raspado ou biópsia da córnea e, muitas vezes, somente após a remoção da córnea (Alves, 2001; Illingworth & Cook, 1998). Em muitos desses casos foi realizada ceratoplastia, por vezes sem sucesso devido à recidiva da infecção, levando à necessidade de remoção do globo ocular. Mesmo após um diagnóstico correto, um outro problema é determinar um tratamento eficaz, uma vez que as amebas desse gênero, especialmente quando na forma de cistos, mostram-se bastante resistentes a uma série de quimioterápicos (Ficker et al., 1990).

2.3.3 Meningoencefalite amebiana primária

O gênero *Naegleria* spp. compreende 30 espécies, sendo *Naegleria fowleri* a única espécie que causa em humanos a Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP), uma infecção não-oportunística, mas de curso rápido e fatal. Geralmente acomete crianças e jovens saudáveis com histórias de terem nadado dias antes em lagos ou piscinas. Uma aparente explicação para a maior incidência em jovens, é o fato de permanecerem mais tempo na água e também de realizarem brincadeiras que revolvam o sedimento do fundo dessas águas contendo a ameba, com isso forçando a água contaminada a entrar pelas narinas e aumentando as chances de invasão pelo organismo (Schuster, 2004). Há também alguns casos relatados em que não existe uma aparente relação com a água (Stevens et al., 1977; Visvesvara et al., 1990).

A porta de entrada para *Naegleria fowleri* pode ser a cavidade nasal, por inalação de poeira ou aspiração de água contaminada com trofozoítos ou cistos. A via de invasão do sistema nervoso central é o epitélio neuro-olfativo e o período de incubação varia de 2 a 3 dias, podendo prolongar-se por 7 a 15 dias. Os primeiros sintomas são: cefaléia intensa e repentina, anorexia, febre, náuseas e vômitos que precedem os sinais de irritação meníngea. Rapidamente, a doença evolui com sinais mais claros de meningoencefalite como: transtornos mentais, confusão, sonolência, delírio e coma. Na grande maioria dos casos fatais, a morte pode ocorrer uma a duas semanas depois do aparecimento dos primeiros sintomas (Visvesvara et al., 1990; Martinez, 1993; Silva & Rosa, 2001; Schuster, 2004).

Como o diagnóstico é difícil e demorado, poucos pacientes infectados com *Naegleria fowleri* sobrevivem. Terapia específica tem pequena influência no curso natural da MAP. Anfotericina B é a droga de escolha, mas só tem eficácia quando a doença é diagnosticada precocemente (Martinez, 1993). Após ter alcançado o cérebro através do epitélio neuro-olfatório, a habilidade da *N. fowleri* em produzir uma infecção rápida e fatal, que é caracterizada por lesões necrotizantes e hemorrágicas do sistema nervoso central, se deve às propriedades de virulência dessa ameba como a liberação de enzimas fosfolipases ou neuroaminidases, que criam poros na membrana da célula alvo pelo efeito lítico e da atividade de estruturas fagocíticas, conhecidas como amebostomas. Essas estruturas, quando observadas por microscopia eletrônica de transmissão, são densamente granulosas, contrastando com o citoplasma altamente vacuolizado da ameba (Silva & Rosa, 2001; Schuster & Visvesvara, 2004b).

As *Naegleria* patogênicas têm sido encontradas principalmente em águas termais e efluentes aquecidos das indústrias. Os casos de infecção humana têm sido correlacionados freqüentemente com importantes alterações ecológicas e, sobretudo, com a contaminação e poluição térmica de cursos de água. Os casos de naegleríase têm sido registrados, de forma esporádica em países localizados em regiões, consideravelmente diferentes como a Austrália, a Nova Zelândia, a ex-Tchecoslováquia, a Bélgica, a Grã-Bretanha, a Nigéria, o Zaire, os EUA e o Brasil. Em sua maioria, os pacientes compreendiam pessoas na faixa etária entre 7 e 20 anos, estando os dois sexos igualmente

representados (Casemore, 1977; Stevens et al., 1977; Schuster & Visvesvara, 2004).

2.4. Identificação do gênero *Acanthamoeba* spp.

Embora a identificação do gênero *Acanthamoeba* possa ser feita pela morfologia de seus trofozoítos e cistos, têm sido demonstrados vários métodos para identificação de espécies de *Acanthamoeba*. Pussard e Pons (1977) classificaram *Acanthamoeba* em três grupos de acordo com o tamanho do cisto e aspectos morfológicos. Grupo I de *Acanthamoeba* spp. têm cistos relativamente grandes, com endocisto estrelado e ectocisto liso e esférico. O grupo II e o grupo III têm cistos menores (diâmetros menores que 18 μm). Espécies do grupo II têm o endocisto estrelado poligonal com o ectocisto irregular ou rugoso, o cistos das espécies do grupo III têm o endocisto arredondado ou fracamente angular e o ectocisto fino e liso ou fracamente franzido. Entretanto, devido à variabilidade da morfologia dos cistos em condições de cultivo, a identificação das espécies somente pela morfologia dificilmente é possível. Por essa razão, investigadores têm usado vários tipos de métodos não morfológicos para a taxonomia de *Acanthamoeba* spp. (Kong, 2002).

Mais recentemente foi estabelecido um novo critério de identificação e taxonomia para *Acanthamoeba*: o uso da seqüência do gene que codifica a subunidade menor do ribossomo 18S (ssu rDNA), dividindo o gênero em 15 grupos, T1 a T15, (Hewett et al., 2003). Em relação à patologia, o resultado mais interessante dessa nova abordagem foi o encontro de uma forte

correlação entre o grupo T4 (*A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. rhysodes*) e a ocorrência de úlcera de córnea, uma vez que somente uma exceção foi observada, mas, mesmo assim, causando uma patologia de aparência diferente do habitual. Embora seja uma associação forte (24 em 25 casos de ceratite causados por organismos do grupo T4), ainda assim resta saber se tal correlação não se deve apenas, por exemplo, a uma maior presença do tipo T4 no ambiente, como os próprios autores reconhecem (Stothard et al., 1999).

Para a caracterização definitiva que permita diferenciar o gênero utilizam-se, por exemplo, técnicas mais precisas como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Mathers e colaboradores (2000) descreveram a PCR como um método sensível para a detecção de culturas de *Acanthamoeba* da superfície ocular. Foram testados 26 casos com 3 pares de oligonucleotídeos. Os oligonucleotídeos de Nelson foram positivos em 22 (85%), os oligonucleotídeos de Lehmann foram positivos em 14 (54%) e os de Vodkin foram positivos em 14 (54%). Dos 3 oligonucleotídeos testados, os de Nelson apresentaram maior positividade nas análises em comparação com os demais testados.

A amplificação do DNA ribossomal de *Acanthamoeba* ssp. por PCR representa um novo método para detecção destes organismos em superfície ocular e tem uma ampla aplicação clínica, já que um único exemplar de *Acanthamoeba* pode conter mais de 100 cópias de DNA ribossomal, o que torna possível a detecção de um número muito pequeno de organismos. Devido a este método ser muito sensível, considerável cuidado deve ser tomado na coleta da amostra e no ensaio, para evitar fontes externas de

replicação de DNA. Esta elevada sensibilidade está associada a uma variável especificidade que é dependente da seleção de oligonucleotídeos (Alves, 2001; Mathers et al., 2000).

A seqüência da subunidade menor (ssu) do gene rRNA é muito útil como um dado molecular para o estudo da filogenia e taxonomia. Em 1998, Stothard e colaboradores, estudando o gene 18S (ssu) rRNA de *Acanthamoeba*, classificaram 53 isolados em 12 diferentes tipos de seqüências. Hewett e colaboradores, em 2003, classificaram até o tipo T15. Entretanto, quando o número de isolados a ser estudado é grande, o seqüenciamento de 2300 pares de bases do gene rRNA é muito trabalhoso, consumindo muito tempo e com custo elevado para a identificação ou caracterização de isolados de *Acanthamoeba*. Portanto, métodos mais simples e com custos mais baixos se fazem necessários.

Segundo Kong e colaboradores (2002) o uso do *riboprinting* (o exame do polimorfismo dos sítios das enzimas de restrição do ssu rRNA codificado pelo DNA (rDNA) amplificado pela PCR) é um método simples, de baixo custo e rápido, que tem sido recentemente usado para estabelecer a relação entre *Entamoeba* spp., *Naegleria* spp. e *Acanthamoeba* spp.

Recentemente foi desenvolvida a quantificação de trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba* spp. pela técnica da PCR em tempo real, que se baseia na hibridização da sonda "TaqMan" com o gene 18S rDNA. Como esse teste é altamente sensível, ele permite a detecção de menos do que 10 células, principalmente quando a ameba é de difícil cultivo. Além disso, os cistos podem ser usados para detectar a *Acanthamoeba* (Rivière et al., 2005).

2.5. Identificação de *N. fowleri*

O diagnóstico de *N. fowleri* em infecções é menos problemática do que o de *Acanthamoeba*, porque uma única espécie de *Naegleria* está envolvida em todas as infecções humanas. A detecção da infecção causada por essa ameba, geralmente é *pos-mortem*. Em face disso, o diagnóstico através da metodologia molecular usando as técnicas de RFLP e RAPD, está mais direcionada para a verificação na diversidade entre a espécie; já que estudos feitos em nível mundial têm encontrado diversidade entre as cepas isoladas de ambientes de diferentes continentes (Kilvington & Beeching, 1995; Pélandakis et al., 1998; Pélandakis & Pernin, 2002; Sheehan et al., 2003).

Para confirmar o teste de exflagelação para *Naegleria*, laboratórios estão usando a metodologia da PCR, de amostras de ambientes e clínicas, devido ao fato de que algumas cepas isoladas em condições laboratoriais não exflagelam, produzindo um resultado falso negativo (Behets et al., 2003).

2.6. Identificação de *Balamuthia mandrillaris* e *Sappinia diploidea*

A identificação dessas duas espécies é baseada nas suas características morfológicas, por PCR e sorodiagnóstico (Gelman et al., 2001; Schuster & Visvesvara, 2004b).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Locais de coleta

O local escolhido para coleta das amostras foi o Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), localizado na cidade de Porto Alegre-RS.

Foram selecionados 15 ambientes distintos para a coleta das amostras, relacionados a seguir: Centro de Terapia Intensiva, Centro Cirúrgico, UTI Pediátrica, Cozinha, Emergência, Centro Cirúrgico Ambulatorial, Reservatório de Azulejo localizado no subsolo, Reservatório de Concreto localizado na área externa do hospital, seis Bebedouros coletivos existentes no hospital e uma torneira da cozinha. As Figuras 1 a 7 ilustram a obtenção das amostras nos diversos ambientes.

Durante as coletas, foram respeitadas as normas exigidas pelo hospital para ingresso em cada ambiente.

Os procedimentos de higienização e desinfecção (Procedimentos Operacionais Padrões - POP's) preconizados e aplicados pelo HCPA nos ambientes desta investigação são descritos a seguir. A limpeza do piso é realizada quando o fluxo de pessoas diminui, utilizando-se detergente neutro. Quando há presença de fluidos corpóreos, os mesmos são removidos antes da aplicação de hipoclorito de sódio a 1%. Nos leitos e móveis que foram ocupados pelos pacientes, é utilizado álcool 70% com fricção durante 30 segundos. Na cozinha, a limpeza do piso é feita à tarde com jatos de água corrente e detergente e a limpeza das bancadas é realizada ao final de cada procedimento (geralmente duas vezes ao dia) com álcool - gel 70%.

Os bebedouros são lavados com hipoclorito a 5% sempre que é percebido gosto metálico na boca. O reservatório de água de concreto (externo) recebe diretamente a água distribuída pelo Departamento Municipal de Água e Esgotos (DMAE), e é higienizado a cada seis meses com hipoclorito de sódio a 1%. Esse reservatório distribui água para o reservatório de azulejo localizado no subsolo do hospital.

3.2 Amostragem

A coleta das amostras foi realizada de julho de 2004 a março de 2005, sempre no período da manhã, entre as 8:00 h e 11:30 h. Durante estes nove meses, foi coletada uma amostra mensal de poeira e/ou biofilme de cada um dos 15 ambientes selecionados, totalizando 135 amostras. Dependendo da amplitude do ambiente, uma amostra foi constituída por até 10 sub-amostras (suabes), conforme mostra a tabela 1.

Os dados climáticos relativos às médias mensais de temperaturas foram obtidos junto ao informativo de meteorologia (INMET) seoma8@inmet.gov.br.



FIGURA 1 – Coleta de amostra de poeira no Centro de Terapia Intensiva do HCPA.



FIGURA 2 – Coleta de amostra de biofilme no Reservatório de Concreto do HCPA.



FIGURA 3 – Coleta de amostra de poeira na UTI Pediátrica do HCPA.



FIGURA 4 – Coleta de amostra de poeira na Cozinha do HCPA.



FIGURA 5 – Coleta de amostra de biofilme no Bebedouro da zona 08 do HCPA.



FIGURA 6 – Coleta de amostra de biofilme no Reservatório de Azulejo do HCPA.



FIGURA 7 – Coleta de amostra de poeira no Centro Cirúrgico do HCPA.

TABELA 1 – Número de sub-amostras (suabes) coletadas nos 15 ambientes hospitalares entre julho/04 e março/05, segundo o tipo de amostra.

Ambiente	Tipo de amostra	N° de sub-amostras por amostra	Total de sub-amostras	Total de amostras
Cozinha 1° andar	Poeira	09	81	09
Torneira/cozinha 1° andar	Biofilme	01	09	09
Emergência 1° andar	Poeira	08	72	09
Centro Cirúrgico Ambulatorial 1° andar	Poeira	06	54	09
Centro Cirúrgico 12° andar	Poeira	10	90	09
UTI Pediátrica 10° andar	Poeira	08	72	09
Centro de Terapia Intensiva 13° andar	Poeira	05	45	09
Reservatório Externo	Biofilme	01	09	09
Reservatório Subsolo Interno	Biofilme	02	18	09
Bebedouro 08 zona 8	Biofilme	01	09	09
Bebedouro 13 zona 13	Biofilme	01	09	09
Bebedouro 14 zona 14	Biofilme	01	09	09
Bebedouro 15 zona 15	Biofilme	01	09	09
Subsolo				
Bebedouro 19 zona 19	Biofilme	01	09	09
Subsolo				
Bebedouro Emergência 1° andar	Biofilme	01	09	09
Total	-	56	504	135

As amostras de poeira e dos biofilmes dos ambientes selecionados foram coletadas com suabes esterilizados e secos, que foram passados de forma aleatória sobre locais das áreas escolhidas, como o piso, janelas, móveis, biofilme de bebedouros coletivos, da torneira e dos reservatórios de água. Os suabes foram guardados em tubos estéreis, identificados, refrigerados e transportados para o laboratório (sala 206), localizado no prédio do ICBS – UFRGS, totalizando em média duas horas de duração da coleta das amostras até o início do seu processamento.

3.3 Processamento das amostras

As amostras foram processadas segundo Silva & Rosa, 2003. Os suabes foram colocados em cálices de sedimentação contendo água destilada esterilizada e, depois de espremidos, foram descartados. Todos os suabes utilizados na coleta de cada ambiente foram submetidos ao processo de sedimentação espontânea em um mesmo cálice. O material ficava sedimentando por 2 horas à temperatura ambiente. O sedimento resultante foi usado como inóculo, para o isolamento e posterior identificação das AVL. A síntese desse procedimento está representada na Figura 8.

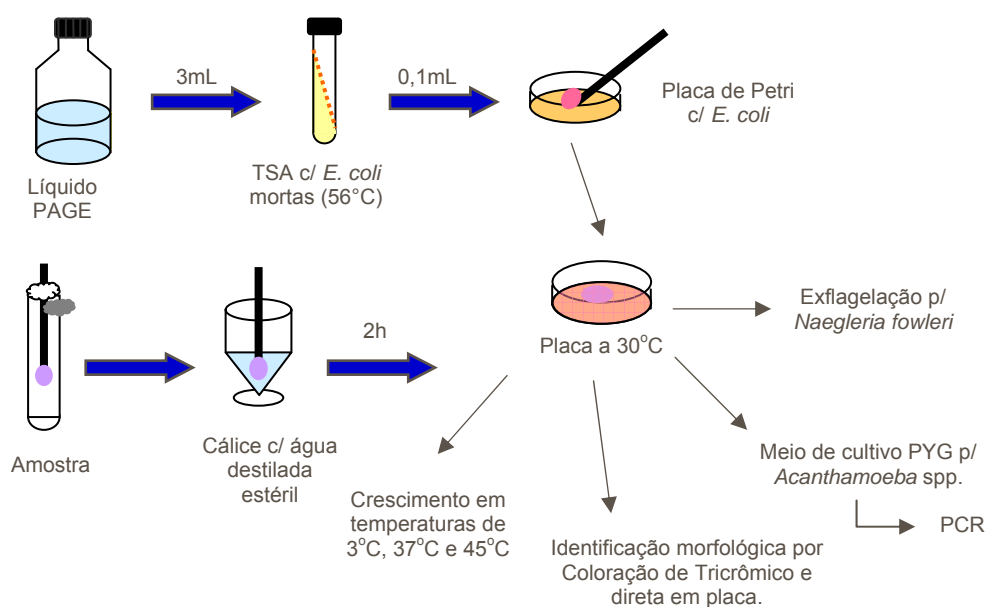


FIGURA 8 – Esquema do processamento das amostras coletadas no HCPA.

3.4 Isolamento e identificação das amebas de vida livre (AVL)

3.4.1 Cepas controle

As cepas controle utilizadas nos experimentos foram: *Acanthamoeba castellanii* Neff (ATCC) e *Escherichia coli* (ATCC), gentilmente doadas pelo prof. Jeffrey D. Cirillo da “University of Lincoln” – EUA e pelo Laboratório de Microbiologia do ICBS – UFRGS, respectivamente.

3.4.2 Cultura Monoxênica

Para o isolamento das amebas, foi utilizado o meio de ágar não-nutriente (ágar Page) 1,5% recoberto com uma suspensão de *Escherichia coli*, mortas pelo calor. Essas bactérias, anteriormente cultivadas em meio TSA a 37°C/24h, foram incubadas com meio de Page (Solução Salina para Ameba - anexo) em banho - maria a 56°C durante duas horas (De Carli, 2001).

O sedimento de cada cálice (100 µL) foi colocado no centro de placas de Petri contendo o ágar Page, previamente inoculadas com uma suspensão de *E. coli*. A seguir as placas foram seladas com Parafilm® e incubadas a 30°C por até 10 dias. A verificação do crescimento amebiano foi realizada diariamente colocando-se a placa invertida sobre a platina de um microscópio óptico usando a objetiva de 10X.

A identificação das amebas baseou-se no tipo de movimento e nos critérios morfológicos dos cistos e trofozoítos segundo Page (1988).

Após 10 dias de observação, as placas que não apresentaram crescimento amebiano foram descartadas. Se verificada a presença de amebas na placa, a área era demarcada com lápis de cera. O lacre de Parafilm® e a

tampa da placa eram removidos, para a extração da área de ágar marcada com auxílio de lâmina estéril. A seguir o extraído foi inoculado com a face voltada para baixo e no centro de outra placa, igualmente inoculada com *E. coli*. Essa placa foi selada com Parafilm® e incubada a 30°C até seis dias, em que se obtinha crescimento amebiano suficiente para as provas de identificação. Todos esses procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar para evitar contaminação.

3.4.3 Cultura Axênica

Após a verificação do crescimento das amebas nas placas, as áreas de crescimento confluyente foram marcadas e as placas foram colocadas sobre bolsas de gelo durante 15 min, para o desprendimento dos trofozoítos. Sob assepsia os trofozoítos foram gentilmente emulsionados em meio de cultivo PYG (Proteose Peptone - Levedo – Glicose) (Anexo) e transferidos para Enlermeyer contendo o mesmo meio suplementado com Penicilina-Estreptomicina (400 µL/mL Penicilina G Potássica e 400 µL/mL Estreptomicina) e incubados a 30°C. (De Carli, 2001).

Sub-culturas para novos tubos contendo PYG foram realizadas durante duas a três semanas em intervalos variáveis, de no máximo 7 dias para eliminar a associação com bactérias.

3.4.4 Criopreservação das cepas axenizadas

As amebas do gênero *Acanthamoeba* spp. foram criopreservadas conforme a técnica descrita por McMillan (1989), usando-se o dimetilsulfóxido

(DMSO) como crioprotetor. Cerca de 1,0 mL de culturas axênicas de *Acanthamoeba* spp. e da cepa controle *Acanthamoeba castellanii* Neff com média de 3 a 5 dias de crescimento, foram transferidas para criotubos com 1,0 mL da solução criopreservadora 5% (Anexo). Os criotubos, presos a um bastão de vidro, foram mergulhados em acetona com fragmentos de gelo seco sublimado (dióxido de carbono – CO₂). Com agitação uniforme e contínua no sentido horário, a temperatura foi baixada em 1°C por minuto, até atingir a marca de – 40°C. Imediatamente após, os criotubos foram mergulhados em nitrogênio líquido (- 196°C), contido em botijão criobiológico.

3.4.5 Exflagelação dos organismos

A identificação de *Naegleria fowleri* foi realizada através da técnica de exflagelação e confirmada em triplicata. Após o crescimento de trofozoítos, a superfície das placas de ágar não-nutriente foi coberta com 10 mL de água destilada estéril e raspada gentilmente com alça de platina. O líquido foi colocado em garrafas estéreis de cultivo (25 cm³) e incubadas a 37 °C. Com microscópio invertido as garrafas foram examinadas para verificar a emissão de flagelos a cada 30 min durante 4 horas. As amostras negativas foram observadas por até 24 horas e, então, descartadas (De Carli, 2001; Silva & Rosa, 2001).

3.4.6 Tolerância à temperatura

As amostras positivas para amebas de vida livre foram submetidas a três diferentes temperaturas (3°C, 37°C e 45°C).

O procedimento foi realizado em triplicata para as temperaturas de 37°C e 45°C, sendo as placas incubadas e observadas diariamente por 10 dias. Para a temperatura de 3°C as placas foram colocadas em geladeira, com temperatura periodicamente monitorada. Após um mês nesta temperatura, os organismos existentes em cada placa foram repicados para avaliar sua viabilidade. O mesmo foi feito para as amostras que foram submetidas às duas outras temperaturas pelo período de 10 dias.

3.4.7 Preparo das Lâminas e Coloração

As placas com crescimento de trofozoítos e cistos de AVL, foram colocadas sobre bolsas de gelo durante 15 min. Em seguida foram abertas, recobertas com solução de PBS estéril e raspadas gentilmente com alça de platina. O líquido foi aspirado para confecção das lâminas.

As lâminas foram colocadas no fixador de Schaudinn (Anexo) durante uma hora à temperatura ambiente. Após fixadas, foram coradas pelo tricrômico (Anexo) conforme Bruckner, 1993. A fixação e a coloração foram realizadas em cubas de *Coplin*. Após a coloração, os esfregaços foram observados ao microscópio óptico com objetiva de imersão (1000X), para a realização do estudo morfológico.

3.4.8 Estudo das características morfológicas das AVL

Foram observados critérios morfológicos, que se basearam nos seguintes parâmetros: movimento, tamanho dos cistos e trofozoítos, tempo de

contração de vacúolos contráteis, presença de acantopódios, aspectos morfológicos dos cistos e dos trofozoítos. Essas características foram observadas em diferentes microscópios e objetivas. O microscópio óptico foi utilizado para placas com aumento de 100X, para o meio líquido de 400X e lâminas coradas de 1000X. O microscópio invertido foi utilizado para observação das placas e crescimento em meio líquido com os aumentos de 100X, 200X, e 400X. O microscópio de contraste de fase com o aumento de 400X, foi utilizado para observação de lâminas confeccionadas a partir de meio líquido. Todos os critérios morfológicos observados foram baseados na chave de Page (1988) e observações contidas em De Carli (2001). Todas as medidas realizadas foram feitas utilizando ocular micrométrica. A identificação das amebas foi realizada pela observação de cistos e trofozoítos e baseadas no tipo de movimento e nos critérios morfológicos de Page (1988).

3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para confirmação da identificação por microscopia, do gênero *Acanthamoeba*, foi empregada a técnica da PCR. Diversos métodos de extração de DNA foram testados e submetidos à PCR.

3.5.1 Amostras

Foram submetidas à extração de DNA e à técnica da PCR as cepas controle (*Acanthamoeba castellanii* Neff e *E. coli*) e as amostras axenizadas.

3.5.2 Extração de DNA

3.5.2.1 Extração através de choque térmico

O volume de 1,0 mL das culturas axênicas com crescimento médio de 4 dias foi centrifugado a 1Krpm por 5 min e o sobrenadante desprezado. A seguir o sedimento foi lavado 3 vezes com 1,0 mL de PBS e por último foi ressuspenso em 1,0 mL de PBS. As células foram contadas em câmara de Fuchs-Rosenthal, 100 células suspensas em 10 µL de PBS foram fervidas durante 5 min a 100°C e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido (-196°C) por 5 segundos. Posteriormente era avaliada a concentração de DNA, por espectrofotometria, de acordo com SAMBROOK et al. (1989).

3.5.2.2 Extração com tampão de lise

A técnica de extração foi de acordo com a descrita por Khan e colaboradores (2001). O procedimento para obtenção dos sedimentos, das culturas axênicas, e a contagem das células foi idêntico ao anterior.

A 100 trofozoítos foram adicionados 100 µl de tampão de lise, contendo proteinase K, MgCl₂, Twen 1%, Tris, KCl (Anexo). A mistura foi colocada em banho maria a 56°C durante 1 hora seguida de incubação a 100°C por 10 min. O material foi centrifugado por 5 min a 2 Krpm. A concentração de DNA foi avaliada de acordo com SAMBROOK et al. (1989).

3.5.2.3 Extração com fenol

A técnica de extração com fenol foi realizada segundo Mathers e colaboradores (2000). O procedimento para a contagem de células foi idêntico aos anteriores. A 100 trofozoítos suspensos num volume de 100 µl de PBS, foram adicionados 10 µl do NaOH 1 M. A mistura foi incubada à 100°C durante 5 min e após foram adicionados 100µl de fenol e foi centrifugado a 12 Krpm por 10min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo limpo e foram, adicionados 100 µl de fenol – clorofórmio (V/V) e centrifugado 12 Krpm durante 10 min. Ao sobrenadante foram adicionados 10 µl de acetato de sódio 3 M (pH 5,2); 250 µl de etanol 100% e 2 µl de glicogênio. A mistura foi incubada a -20°C “overnight”. Posteriormente foi centrifugado a 12 Krpm durante 10min e foi descartado o sobrenadante. O precipitado foi lavado com álcool 70% e centrifugado 12 Krpm durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido com 50 µl TE (Tris – EDTA). A concentração de DNA foi avaliada de acordo com SAMBROOK et al. (1989).

3.5.3 Oligonucleotídeos utilizados e suas seqüências

A seqüência alvo do organismo em estudo, gênero *Acanthamoeba*, está localizada no gene ssu rDNA que codifica a subunidade menor 18S do RNA ribossomal.

Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho foram confeccionados pela empresa Invitogen™ Life Technologies, baseados no trabalho de Mathers, 2000, (oligonucleotídeos de Nelson), conforme seqüência abaixo:

Oligonucleotídeo “Forward” 5’ GTTTGAGGCAATAACAGGT 3’

Oligonucleotídeo “Reverse” 5’ GAATTCCTCGTTGAAGAT 3’

3.5.4 Condições de amplificação da seqüência alvo do gene ssu rDNA por PCR

A PCR foi realizada usando-se 20 a 30 ng de DNA, 5mMol de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 100 ng de cada oligonucleotídeo, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen™), tampão de reação (50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl) e 1,0 mM de MgCl₂, num volume total de 25 µl. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador PTC - 150 Minicycler MJ Research, nas seguintes condições: 1 min a 94 °C e após, 1 min a 65°C por 52 ciclos e mais 10 min a 65°C, (Mathers et al, 2000)

Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento das Amebas de Vida Livre (AVL)

Das 135 amostras de poeira e biofilmes, coletadas dos 15 ambientes selecionados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre – RS (HCPA) entre os meses de julho de 2004 e março de 2005, 47 (35%) foram positivas para Amebas de Vida Livre (AVL). Foram isoladas amebas de vida livre em todos os ambientes analisados, exceto no Centro de Tratamento Intensivo (CTI). Este número de isolados é relativamente elevado, a exemplo dos resultados obtidos por outros pesquisadores.

Os relatos sobre o isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas a partir de poeira são escassos. Kingston & Warhurst, 1969, isolaram essas amebas da poeira e do ar de um quarto ocupado por crianças acometidas de infecção respiratória. Foram utilizadas amostras coletadas através da aspiração do ar ambiente. Os autores isolaram 12 cepas de amebas do gênero *Acanthamoeba* e 03 de *Naegleria*.

Giazzi (1996), estudando a prevalência de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em vários habitats na cidade de Araraquara, São Paulo, coletou 23 amostras de poeira, obtendo um percentual de 86,9% para espécies de *Acanthamoeba*, e de 39,1% para espécies de *Naegleria*.

Em um estudo, realizado por Rohr e colaboradores (1998), em 6 hospitais na Alemanha, foram encontradas 29 (52%) amostras positivas para amebas de vida livre em 56 amostras de água coletadas de sistemas de água quente e 23 (47%) de 49 amostras coletadas com suabes das áreas úmidas de

sanitários. Nesse estudo, os autores identificaram grande variedade de espécies de AVL presentes nas áreas úmidas, com 41 organismos identificados pertencentes a 6 diferentes gêneros. *Acanthamoeba* e *Naegleria* foram os gêneros mais isolados, ambos com percentual de 22%.

Silva & Rosa (2003) isolaram AVL potencialmente patogênicas em 60 (45,5%) amostras de poeira de um total de 132, coletadas em dois hospitais da cidade de Presidente Prudente – SP.

4.2. Resultados segundo a época do ano

Durante o período em que ocorreram as coletas (julho de 2004 a março de 2005), o maior número de amostras positivas para AVL (11), ocorreu no mês de janeiro de 2005. A temperatura média desse mês era de 26,8⁰C. O segundo mês com maior positividade, foi março de 2005, com 08 amostras positivas e temperatura média desse mês da coleta era de 18,3⁰C. Os menores índices de positividade ocorreram nos meses de julho e setembro de 2004, ambos com duas amostras positivas para AVL. As temperaturas médias desses meses foram de 12,5⁰C e 17,8⁰C, respectivamente. O número de amostras positivas em cada mês nas nove coletas realizadas no HCPA está representado na Figura 9.

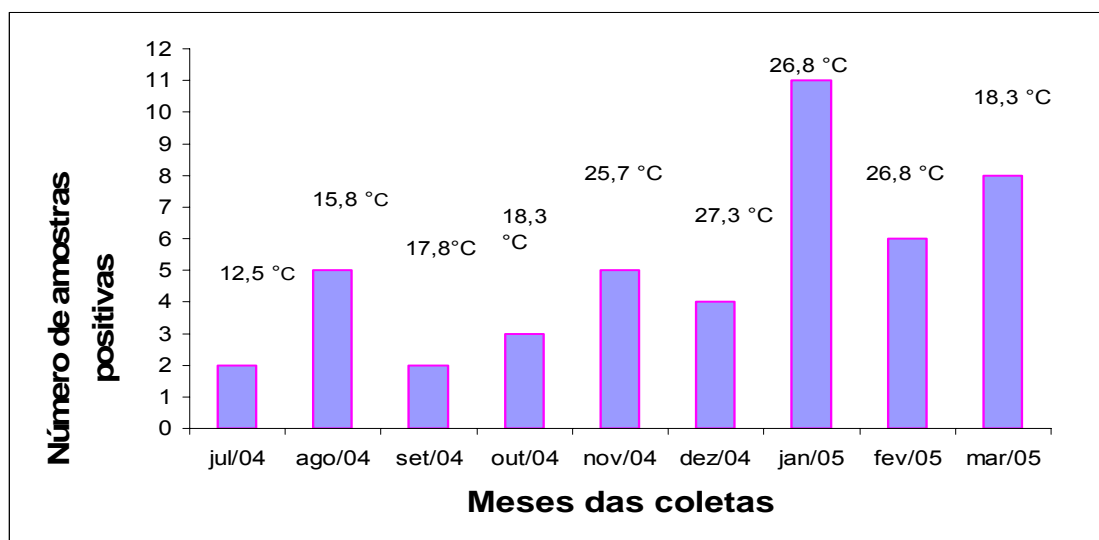


FIGURA 9 – Distribuição mensal do número de amostras positivas para AVL coletadas no ambiente hospitalar no período julho de 2004 a março de 2005 e as médias das temperaturas mensais.

Poucos estudos relatam a sazonalidade de AVL em amostras ambientais. Entretanto, alguns autores apontam a hipótese, de que as AVL são mais prevalentes em locais com climas mais quentes ou amenos ou nos meses de verão (Tsvetkova et al., 2004), enquanto outros afirmam que a produção de cistos altamente resistentes por estes protozoários poderia explicar porque em alguns trabalhos não houve diferença significativa entre o número de isolados de amebas obtidas durante as diferentes estações do ano (De Jonckheere, 1991).

Em 1993, Rivera e colaboradores pesquisaram a presença de AVL em água de 12 piscinas e 13 banheiras de hidromassagem e relataram alta positividade no verão e uma queda considerável na ocorrência nos meses de inverno. Esses achados estão em concordância com os resultados do presente estudo em que a maior positividade ocorreu durante os meses mais quentes, com 11 amostras positivas no mês de janeiro, 6 em fevereiro e 8 em março de 2005, havendo um decréscimo da positividade nos meses com temperaturas mais amenas ou frias.

4.3. Resultados de acordo com o tipo de material coletado

Dois tipos de material foram coletados: poeira ou biofilmes. Das 47 (35%) amostras positivas para AVL, 11 (23,4%) foram de poeira provenientes de cinco ambientes: Cozinha (CZ), Emergência (EM), Centro Cirúrgico Ambulatorial (CA), Centro Cirúrgico (CC), e UTI Pediátrica (UT) e 36 (76,6%) de biofilmes provenientes de seis Bebedouros (B), dois Reservatórios de água (RA e RC) e uma Torneira da Cozinha (TCZ).

Silva & Rosa em 2003 analisando a poeira de 2 hospitais, no estado de São Paulo, obtiveram de 72 amostras de poeira coletadas no Hospital Universitário, 30 (41,6%) positivas para AVL potencialmente patogênicas. No segundo, Hospital Estadual, foram coletadas 60 amostras de poeira, sendo observadas AVL potencialmente patogênicas em 30 (50%) das amostras.

No presente estudo, isolou-se 47 (35%) AVL, nas 135 amostras de poeira e biofilmes coletadas nos ambientes do HCPA.

Em outro estudo, Barbeau & Buhler (2001), analisando amostras de biofilmes de 35 equipos dentários e de 18 torneiras, relataram o isolamento de AVL nos 53 ambientes coletados. Em relação à concentração de AVL isoladas dos biofilmes, os autores chegaram à conclusão de que os equipos dentários tinham uma concentração de AVL três vezes mais alta do que nas amostras de torneira.

Na presente pesquisa foram obtidos 36 isolados de AVL de 06 bebedouros, 01 torneira e de 02 reservatórios de água avaliados, sendo, portanto as amostras de biofilmes as que apresentaram maior percentual de positividade quando comparadas às de poeira. Embora, os autores do trabalho

anteriormente mencionado não tenham coletado amostras de poeira, a positividade em biofilmes para AVL é quase sempre 100% segundo trabalhos citados na literatura e a explicação para esse fato, é que AVL se aderem aos biofilmes para se alimentar das bactérias que os colonizam. Os autores do estudo citado acima, ainda relatam que os equipos dentários tiveram significativa positividade, devido esse material ter um diâmetro menor para passagem de líquidos fazendo com que o contato de bactérias com os equipos seja grande, com isso criando biofilmes em toda extensão da tubulação. Essa justificativa é coerente com nossos resultados para as amostras de biofilme, pelo fato de que nossas coletas nos bebedouros foram realizadas na saída de água de menor diâmetro.

4.4. Resultados por ambiente selecionado

A Tabela 2 e a figura 10 resumem os resultados obtidos nas nove coletas, referentes à presença de AVL nos ambientes hospitalares investigados.

TABELA 2 – Número e percentual de amostras positivas para AVL em diferentes ambientes hospitalares, no período de julho/04 a março/05.

Ambiente	Nº de amostras positivas	Percentual de amostras positivas:	
		Em relação às coletas do ambiente (n=9)	Em relação às coletas do hospital (n=135)
Cozinha	06	66,7%	4,4%
Centro cirúrgico	01	11,1%	0,7%
UTI pediátrica	01	11,1%	0,7%
Centro Cirúrgico Ambulatorial	01	11,1%	0,7%
Emergência	02	22,2%	1,5%
CTI	00	0	0%
Bebedouro 08	07	77,8%	5,2%
Bebedouro 13	02	22,2%	1,5%
Bebedouro 14	07	77,8%	5,2%
Bebedouro 15	05	55,6%	3,7%
Bebedouro 19	06	66,7	4,4%
Bebedouro emergência	02	22,2%	1,5%
Reservatório Azulejo	04	44,4%	3%
Reservatório concreto	01	11,1%	0,7%
Torneira/Cozinha	02	22,2%	1,5%
Total	47	53%	35%

Dos 15 ambientes selecionados para amostragem, o centro de tratamento intensivo (CT) foi o único em que não foram isoladas AVL durante os nove meses em que ocorreram as coletas. Por outro lado, os bebedouros 08 e 14 foram os que apresentaram a maior contaminação por AVL, com 14 amostras positivas dentre as 18 coletadas.

A maior positividade nos bebedouros já era um dado esperado, visto que o material daí coletado eram os biofilmes, fato já discutido no item 4.3.

No estudo de Silva & Rosa (2001), os autores avaliaram a presença de AVL somente na poeira de diversos ambientes hospitalares e verificaram maior positividade na cozinha e no berçário, provavelmente devido à maior umidade desses locais e também devido ao maior número de pessoas

circulando no ambiente. O menor índice de positividade no referido trabalho ocorreu no centro cirúrgico e UTI, ambientes onde existe um maior cuidado com a limpeza e há um número restrito de profissionais circulando.

Os resultados do presente trabalho concordam em relação à positividade de alguns ambientes igualmente selecionados, especialmente em relação à menor positividade, que ocorreu a exemplo do trabalho de Silva & Rosa, em ambientes como o centro cirúrgico, UTI pediátrica e centro de tratamento intensivo. Os resultados, provavelmente se devem ao fato de que nesses locais, por abrigarem pacientes de risco, além da maior preocupação com limpeza e desinfecção, o acesso de pessoas é normalmente restrito a poucos profissionais, que fazem uso de equipamentos de proteção individual, como luvas, máscaras, gorros, protetores de pés e roupas apropriadas e esterilizadas. Esses cuidados poderiam contribuir para a diminuição da contaminação desses ambientes, já que se sabe que espécies de *Acanthamoeba* têm sido isoladas como flora microbiota normal das vias aéreas superiores de indivíduos saudáveis (Martinez, 1993).

Na presente pesquisa, a cozinha foi o segundo ambiente que apresentou o maior índice de contaminação por AVL. Neste local, quando da realização das coletas, também observou-se a presença de umidade e um número grande de pessoas circulando. Também observou-se que *Acanthamoeba* spp. foi isolada em 4 coletas realizadas no reservatório de azulejo, localizado no subsolo do HCPA, e que a água deste reservatório é distribuída para todo o hospital.

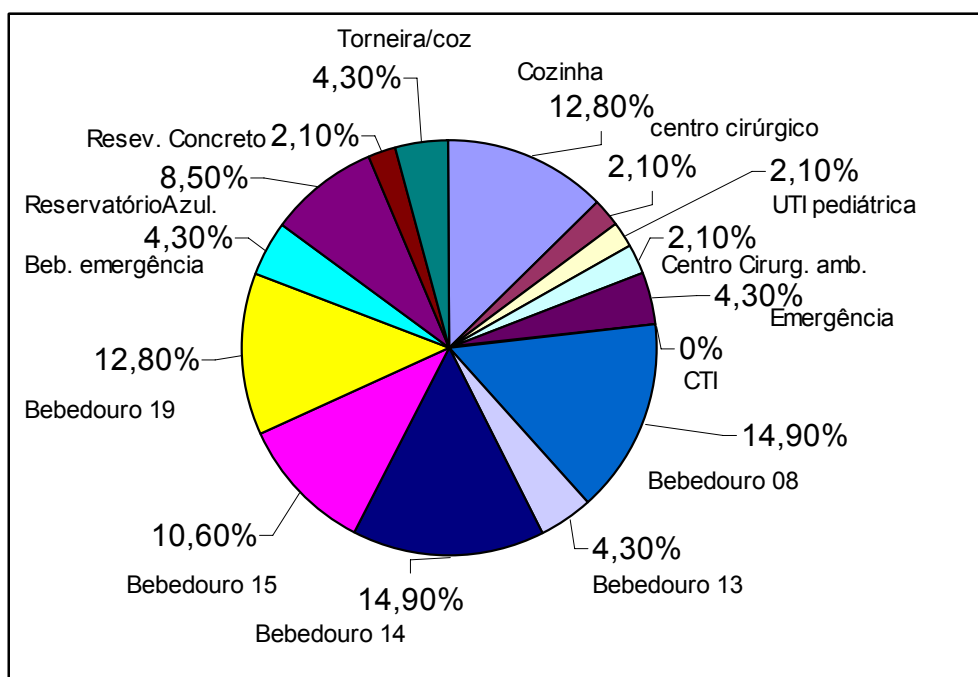


FIGURA 10- Percentual de positividade para AVL nos ambientes hospitalares em relação ao total de isolados.

Giazzi (1996), estudando a prevalência de AVL em ambientes abertos e fechados não encontraram diferença significativa entre outros. Os resultados do presente trabalho mostram isolamento de espécies de AVL em praticamente todos os ambientes estudados no HCPA, com exceção da CTI. É preocupante a ocorrência dessas amebas, já que muitos pacientes internados em hospitais têm sua imunidade deprimida, seja naturalmente devido a doenças ou à pouca idade, ou artificialmente pelo uso de drogas imunossupressoras. Outros são submetidos a cirurgias ou podem, ainda, apresentar problemas de queimadura em áreas extensas da pele, o que pode facilitar a implantação de germes oportunistas, entre os quais, espécies de *Acanthamoeba*.

4.5. Identificação do gênero *Naegleria*

Para identificação do gênero *Naegleria* foi realizada em triplicata a técnica da exflagelação. Dos 47 isolados de AVL, provenientes dos ambientes hospitalares do HCPA, nenhum apresentou exflagelação.

Diversos autores concordam que existe certa dificuldade em isolar *Naegleria fowleri* do ambiente (Pernin et al., 1998). Pesquisas realizadas nos mais diversos ambientes, em geral mostram percentuais bem menores de isolados de *Naegleria* em relação a outras AVL (Tsvetkova et al., 2004).

Uma explicação para os baixos índices de recuperação de *N. fowleri* do ambiente seria sua fragilidade. Cursons e colaboradores (1980), estudando a resistência das AVL frente ao efeito de alguns desinfetantes como Deciquam 222, cloro, dióxido de cloro e ozônio, verificaram que todos demonstraram ação desinfetante contra as AVL, porém, eram necessárias concentrações mais altas do que as usadas contra as bactérias. Neste trabalho, os autores também observaram que o número de isolados do gênero *Acanthamoeba* após a desinfecção do ambiente com cloro, era maior que o de *Naegleria* spp., indicando a maior resistência desse organismo ao desinfetante, mostrando que 0,79mg/L foi suficiente para eliminar *Naegleria* spp., enquanto para eliminar *Acanthamoeba* foi necessário 1,25mg/l de cloro total disponível. Todas as afirmações acima mencionadas podem servir de alerta a respeito desses achados nesse tipo de ambiente hospitalar, principalmente sabendo-se da resistência dessa ameba especialmente ao cloro.

No presente estudo quando foram realizadas as coletas, houve a informação de que era feita uma limpeza com hipoclorito a 1% no reservatório

de concreto a cada seis meses e nos bebedouros era usado hipoclorito a 5%, cada vez que era percebido gosto metálico na água. O uso freqüente desse desinfetante em alguns locais, poderia explicar a ausência de isolados de *Naegleria* no ambiente hospitalar. As primeiras amostras positivas para o gênero *Acanthamoeba* no reservatório de água apareceram quando já se fazia necessária nova limpeza e aplicação de hipoclorito a 1%.

Outro estudo realizado por Silva & Rosa (2003) em poeira de ambientes hospitalares na cidade de Presidente Prudente – SP, entre os meses de agosto e novembro de 2002, relatou 45,5% de *Acanthamoeba* spp. e 3,8% de *Naegleria* spp. No referido trabalho foi usada a técnica de exflagelação para identificar o gênero *Naegleria*. A maioria dos isolados de *Naegleria* spp. eram provenientes da cozinha de um dos hospitais, onde observaram ocorrência de umidade por longos períodos. A explicação dos autores para seus achados baseou-se no fato de que os cistos de *Naegleria* são poucos resistentes à dessecação e a desinfetantes, fazendo com que apareçam menos em ambientes mais secos ou sujeitos a desinfecções periódicas (Schuster & Visvesvara, 2004a; Singh & Das, 1972).

4.6 Tolerância à temperatura

As 47 amostras positivas para AVL que foram isoladas no ambiente hospitalar do HCPA, foram submetidas a três diferentes temperaturas (3⁰C, 37⁰C e 45⁰C). Os isolados receberam nomes de acordo com o ambiente de onde foram isolados e com o número da coleta. Destes, 20 isolados cresceram a 37⁰C, um cresceu a 45⁰C e todos os 47 isolados mantiveram-se viáveis a 3⁰C

por 30 dias. A Tabela 3 relaciona quais os isolados que tiveram crescimento a 37°C e 45°C, bem como mostra os isolados sugestivos de pertencer ao gênero *Acanthamoeba* que cresceram nessas temperaturas.

TABELA 3 - AVL isoladas das amostras de poeira e biofilme que cresceram a 37°C e a 45°C.

Isolados	Temperaturas		<i>Acanthamoeba</i>
	37° C	45° C	
CZ2	+	-	Sim
CZ5	+	-	Sim
CZ7	+	-	Sim
CZ9	+	-	Sim
EM7	+	-	Sim
B086	+	-	Não
B137	+	-	Não
B143	+	-	Não
B144	+	-	Não
B146	+	-	Não
B149	+	-	Não
B157	+	-	Não
B159	+	+	Não
B192	+	-	Não
B196	+	-	Não
B199	+	-	Não
RA6	+	-	Sim
RA7	+	-	Sim
RA8	+	-	Sim
BEM7	+	-	Não
Total	20	01	08

(+) Crescimento (-) Ausência de crescimento

Sim: sugestiva de pertencer ao gênero *Acanthamoeba*

Não: sugestiva de não pertencer ao gênero *Acanthamoeba*

Muitos autores referem a possibilidade de a termotolerância constituir-se em um fator que pode determinar a patogenicidade de um isolado (Ma et al., 1981; Mathers et al., 2000).

Em 2002, Schuster usou amostras clínicas como líquido cefalorraquidiano, tecido cerebral, lesões da pele e raspado da córnea para isolar AVL potencialmente patogênicas. A partir destas amostras, o isolamento

em ágar não-nutriente com bactérias ocorreu em 1 a 2 dias a uma temperatura de 37°C, mostrando que a esta temperatura *Acanthamoeba* apresenta fácil crescimento. Em outro trabalho, Schuster & Visvesvara (2004a), comentaram que o aquecimento global tem causado certa preocupação a respeito da dispersão das doenças parasitárias. Em relação às AVL no solo, a elevação da temperatura poderia aumentar o surgimento de espécies termotolerantes, que se adaptariam melhor quando da invasão em humanos ou animais. Eles afirmaram, porém, que termotolerância não é necessariamente sinônimo de patogenicidade ou virulência para o crescimento das AVL, em temperaturas iguais ou superiores a 37°C. Silva & Rosa (2003) submeteram 60 cepas isoladas dos hospitais às temperaturas de 37°C e 42°C e constataram que 51 isolados de AVL pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* e 5 do gênero *Naegleria* cresceram a 37°C, enquanto que apenas um isolado do gênero *Acanthamoeba* cresceu a 42°C. Segundo Kingston & Warhurst (1969), amebas que não podem crescer a 37°C não seria capazes de infectar o cérebro.

Acanthamoeba é encontrada em água doce e do mar. Sua fonte primária de alimentação são as bactérias, que podem estar em grandes quantidades em áreas poluídas, proliferando-se facilmente em temperaturas amenas. Além disso, o aumento da temperatura ambiental induz o uso de aparelhos de refrigeração de ar em salas fechadas. Sabe-se que *Acanthamoeba* pode se proliferar nestes equipamentos a uma temperatura mais baixa. No presente estudo, verificou-se que os 47 isolados no HCPA apresentaram viabilidade quando submetidas a uma temperatura de 3°C por 30 dias. Assim, pode-se sugerir que os indivíduos que freqüentemente utilizam

salas fechadas com refrigeradores de ar permanentemente ligados, estariam mais expostos à bactéria *Legionella pneumophila*, causadora da legionelose, já que a *Acanthamoeba* está implicada como uma das únicas maneiras desta bactéria, entre outras, sobreviver como seu endossimbionte no ambiente. Esse organismo consegue sobreviver à fagocitose da *Acanthamoeba* e se replicar nos vacúolos. Outro dado interessante, é que a *Acanthamoeba* poderia aumentar ou manter a virulência dessa bactéria, além de ter um papel na sobrevivência de bactérias patogênicas no ambiente (Cirillo et al., 1994; Newsome et al., 1998; Molmeret et al., 2005).

Rohr e colaboradores (1998) pesquisando AVL em sistemas de água quente de um hospital na Alemanha, isolaram AVL que até então não haviam sido relatadas causando doença em humanos ou animais. Essas AVL cresciam à temperatura de até 55,7°C, e pertenciam aos gêneros *Hartmannella*, *Saccamoeba* e *Vahlkampfia*.

No presente estudo foi isolada apenas uma AVL que cresceu a 45°C, porém, não foi possível realizar a sua identificação pelos métodos utilizados e praticamente descartam a possibilidade de pertencer aos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*. A ameba termotolerante foi isolada do bebedouro localizado no subsolo do HCPA. Outros achados de *Acanthamoeba* tolerante à temperatura de 37°C ocorreram na cozinha e na emergência, onde existe grande circulação de pessoas que poderiam estar dispersando estas amebas. Segundo Chappell e colaboradores (2001), a *Acanthamoeba* coloniza a mucosa nasal de indivíduos assintomáticos, o que pode ser constatado pela presença de anticorpos contra essa ameba nesses indivíduos.

Outro achado do presente estudo mostra que 75% dos isolados que cresceram a 37^oC eram provenientes de biofilmes e 25% de amostras de poeira, fato este que é preocupante pela frequência com que o ser humano entra em contato com estes biofilmes e em consequência com as AVL termotolerantes, que mais facilmente poderiam se adaptar à vida parasitária.

Barbeau & Buhler, (2001) constataram a presença de grandes concentrações de AVL em biofilmes de equipo dentário e torneiras. Além disso, existem vários relatos na literatura a respeito dos biofilmes em lentes de contato e nos estojos onde os usuários as guardam, sendo os autores unânimes na opinião de que a falta de cuidados, principalmente pelo uso de soluções de limpeza não esterilizadas, facilitaria a criação de biofilmes que podem apresentar AVL, inclusive a *Acanthamoeba*, causadora de ceratite crônica, doença esta que vem aumentando e que na grande maioria dos casos está implicada com o aumento do uso de lentes de contato (Mathers et al., 2000; Kong et al., 2001; Ma et al., 1981).

4.7. Isolamento e identificação do gênero *Acanthamoeba*:

Das 47 amostras positivas para AVL, 16 (34%) são sugestivas de pertencer ao gênero *Acanthamoeba*. Os isolados apresentaram trofozoítos com locomoção lenta, citoplasma com zona periférica hialina, a partir de onde se notaram projeções hialinas e delgadas, os filopódios ou acantopódios e a presença de vacúolos pulsáteis ou contráteis no citoplasma. Os cistos apresentaram parede com membrana dupla, sendo o endocisto triangular, estrelado ou poligonal e o ectocisto enrugado. Considerando-se o total de

amostras coletadas, 11,9% dos isolados apresentaram características do gênero *Acanthamoeba* (Tabela 4).

TABELA 4 - Amebas de vida livre potencialmente patogênicas do gênero *Acanthamoeba*, isoladas de amostras de poeira e biofilme, coletadas no período julho de 2004 a março de 2005, no HCPA.

AVL	Amostras positivas	% em relação às amostras coletadas (n=135)	% em relação às amostras positivas (n=47)
<i>Acanthamoeba</i>	16	11,9%	34%
Outras AVL	31	23%	66%
Total	47	35%	100%

Os locais de onde foram isoladas as amebas de vida livre sugestivas de pertencerem ao gênero *Acanthamoeba*, bem como seus percentuais em relação ao total de amostras coletadas (n=135) e ao total de amostras positivas (n=47) estão representados na Tabela 5.

TABELA 5 - Número de amostras positivas para *Acanthamoeba* por ambiente e percentuais em relação ao total de amostras coletadas e em relação ao total de amostras positivas.

Ambientes Hospitalares	Número de isolados sugestivos de <i>Acanthamoeba</i>	% em relação ao n° total de amostras coletadas	% em relação ao n° total de amostras positivas
B14	1	0,7%	2,1%
CC	1	0,7%	2,1%
CA	1	0,7%	2,1%
CZ	6	4,4%	12,8%
EM	2	1,5%	4,2%
RA	4	3%	8,5%
UT	1	0,7	2,1%
Total	16	11,8%	34%

B: bebedouro; CC: Centro Cirúrgico; CA: Centro Cirúrgico Ambulatorial; CZ: Cozinha; EM: Emergência; RA: Reservatório Azulejo; UT: UTI Pdiátrica.

Os resultados encontrados no presente estudo são semelhantes àqueles encontrados pela maioria dos autores que estudaram AVL nos mais

variados ambientes, sendo o gênero *Acanthamoeba* o mais isolado mundialmente entre as AVL, principalmente devido à resistência de seus cistos às variações ambientais (Barbeau & Buhler, 2001; Khan, 2003; Chappell et al., 2001; Schuster & Visvesvara, 2004b). Silva & Rosa (2003) isolaram AVL de poeira em todos os ambientes hospitalares analisados, sendo 45,5% pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* do total de 60 AVL isoladas.

4.7.1 Características morfológicas das AVL potencialmente patogênicas pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*:

O estudo morfológico das AVL potencialmente patogênicas, pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*, foi realizado através de análises microscópicas usando aumento de 100X, pelas medidas de cistos e trofozoítos com régua micrométrica, resultado da média de 20 estruturas observadas, além da contagem do tempo de contração dos vacúolos pulsáteis dos organismos, resultado da média de 5 organismos observados obtidos em culturas monoxênicas. Os resultados do estudo estão representados na Tabela 6.

TABELA 6 - Características de trofozoítos e cistos de AVL potencialmente patogênicas pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*.

Cepas	XT ^a (n=20)	DP	A	XC ^b (n=20)	DP	A	XTC ^c (n=5)
B147	31,5	3,9	22,5-37,5	15,5	1,5	15-21	18
CC7	26,1	4,5	13,5-33,8	12,2	3,1	7,5-17,3	29
CA7	27,2	5,2	22,5-37,5	14,9	0,7	12-15,8	25
CZ2	22,5	2,4	18,8-30	10,3	2,7	7,5-15	14
CZ4	30,7	3,1	26,2-39	10,7	4,4	7,5-15	23
CZ5	28,1	5,3	22,5-37,5	12,9	2,9	7,5-15,8	25
CZ7	25,2	3,5	22,5-30	14,6	1,2	9,75-15	20
CZ8	23,5	3,5	15,8-30	14,7	0,9	11,3-15	31
CZ9	25,9	3,2	21-30	14,6	1,8	9-16,5	31
EM7	29,1	3,2	22,5-30,8	15,6	1	14,3-18,8	21
EM8	25,6	3,7	17,3-33,8	14,3	1,6	11,3-16,5	23
RA6	37,6	6,4	30-52,5	17,8	3,5	15-22,5	22
RA7	32,4	3,8	27,8-37,5	15,5	1,2	15-20,2	24
RA8	28,9	4,6	22,5-37,5	15	0,2	15-15,8	24
RA9	26,1	4	18,8-33,8	13,4	1,7	9,8-15	23
UT9	27,6	3,4	22,5-31,5	14,9	1	12,8-16,5	26
Média	28	-	-	14,2	-	-	24

XT^a= média do diâmetro dos trofozoítos (μm).

DP= Desvio Padrão.

A= Amplitude.

XC^b= média do diâmetro dos cistos (μm).

XTC^c= média do tempo de contração dos vacúolos pulsáteis (segundos).

Além das medidas de cistos e trofozoítos e da observação do tempo de contração dos vacúolos pulsáteis, características como locomoção lenta, citoplasma com endoplasma e ectoplasma bem definidos, presença de acantopódios (projeções hialinas e delgadas emitidas da membrana citoplasmática) e presença de um núcleo com halo perinuclear, foram observados nos trofozoítos, enquanto os cistos apresentaram parede com membrana dupla, sendo o endocisto triangular, estrelado ou poligonal e o ectocisto enrugado coincidindo com imagens e observações contidas na chave de Page (1988) (Figuras 22 – 24). As imagens foram fotografadas e comparadas às fotos existentes na referida chave de identificação (Figuras 11 - 21).

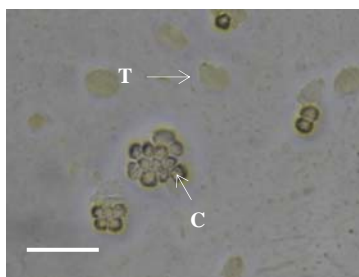


FIGURA 11 – Cistos e trofozoítos sugestivos de *Acanthamoeba* spp. em ágar não-nutriente. T: trofozoíto; C: cisto. Microscópio óptico (100X). Medida da barra 60µm.

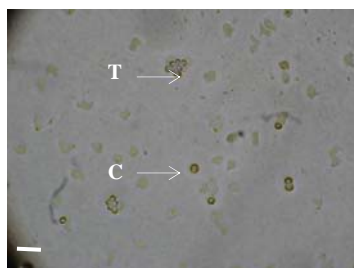


FIGURA 12 – Cistos e trofozoítos sugestivos de *Acanthamoeba* spp. em ágar não-nutriente. T: trofozoíto; C: cisto. Microscópio óptico (100X). Medida da barra 60 µm.

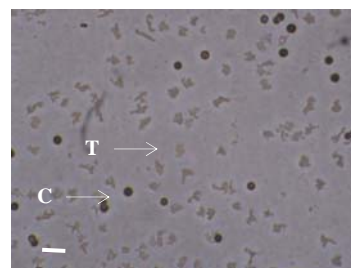


FIGURA 13 - Cistos e trofozoítos sugestivos de *Acanthamoeba* spp. em ágar não-nutriente. T: trofozoíto; C: cisto. Microscópio óptico (100). Medida da barra 60 µm.



FIGURA 14 – Cisto sugestivo de *Acanthamoeba* spp. corado pelo Tricrômico. Pode-se observar o endocisto (seta) com forma estrelada. Microscópio óptico (1000X). Medida da barra 30 µm.

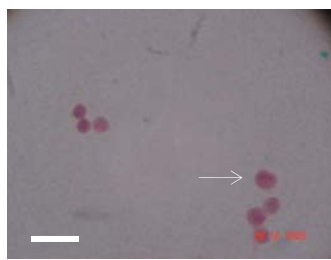


FIGURA 15 – Cistos sugestivos de *Acanthamoeba* spp. corados pelo Tricrômico (seta). Microscópio óptico (1000X). Medida da barra 60 µm.



FIGURA 16 – Cistos sugestivos de *Acanthamoeba* spp. corados pelo Tricrômico (seta). Microscópio óptico (1000X). Medida da barra 30 µm.

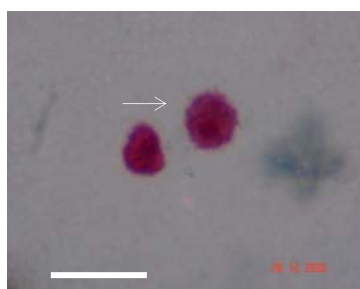


FIGURA 17 – Trofozoítos sugestivos de *Acanthamoeba* spp. corados pelo Tricrômico (seta). Microscópio óptico (1000X). Medida da barra 60 µm.

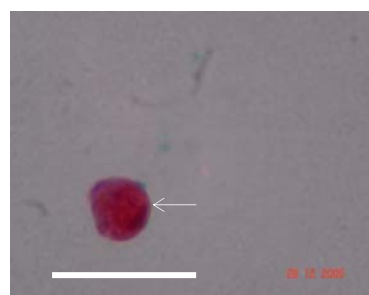


FIGURA 18 – Trofozoíto sugestivo de *Acanthamoeba* spp. corado pelo Tricrômico (seta). Microscópio óptico (1000X). Medida da barra 60µm.

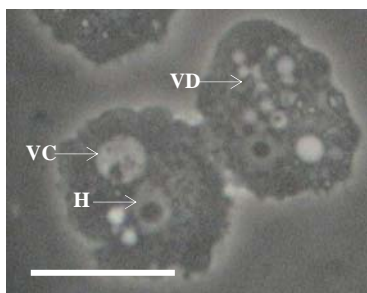


FIGURA 19 – Trofozoítos em meio PYG, onde pode ser visto o halo perinuclear (H), vacúolo contrátil (VC) e vacúolos de digestão (VD). Microscópio contraste de fase (400X). Medida barra 30 μm .

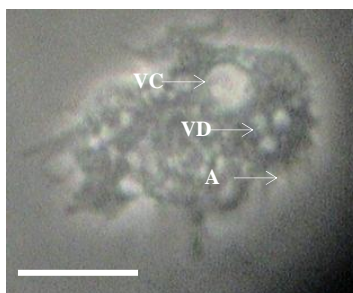


FIGURA 20– Trofozoíto meio PYG, onde podem ser vistos os acantopódios (A) e vacúolos contrátil (VC) e digestivo (VD). Microscópio contraste de fase (400X). Medida barra 15 μm .

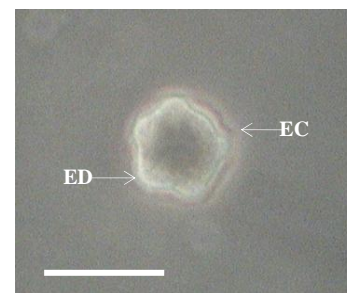


FIGURA 21 – Cisto em meio PYG, onde pode ser visualizado o endocisto (ED) poligonal e o ectocisto (EC) enrugado. Microscópio contraste de fase (400X). Medida barra 20 μm .

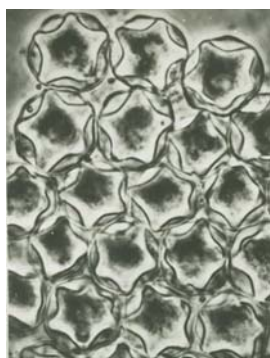


FIGURA 22 – Cisto com endocisto em forma de estrela de *Acanthamoeba* spp. (Page, 1988).

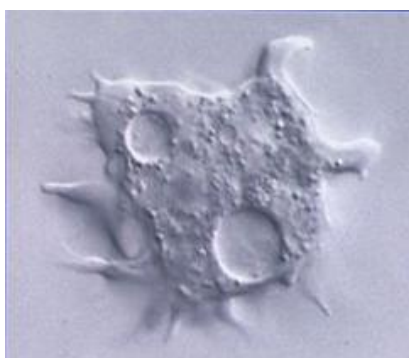


FIGURA 23 – Trofozoíto de *Acanthamoeba* spp. apresentando acantopódios e vacúolos contráteis (Page, 1988).

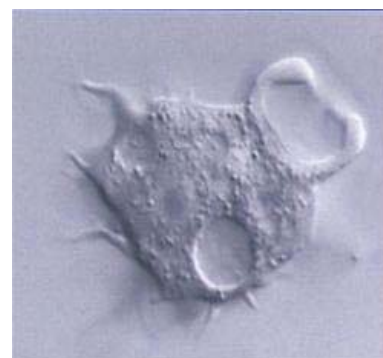


FIGURA 24 – Trofozoíto de *Acanthamoeba* spp. apresentando acantopódios e vacúolos contráteis (Page, 1988).

Schuster & Visvesvara (2004), revisando dados da literatura, em relação ao tamanho dos cistos e trofozoítos e outras características morfológicas do gênero *Acanthamoeba*, verificaram que a dimensão dos trofozoítos varia entre 15 e 30 μm e dos cistos entre 10 e 15 μm . Além disso, apontaram a presença de acantopódios nos trofozoítos, bem como cistos de parede dupla com poros.

Tsvetkova e colaboradores (2004) estudando isolados de *Acanthamoeba* de ambientes na Bulgária, também observaram a presença de acantopódios no trofozoíto, com dimensões que variam entre 19,1 e 28,9 μm , eram uninucleados e com evidente vacúolo contrátil em seus citoplasmas. Os cistos variaram entre 11,0 e 16,1 μm e apresentaram uma dupla parede com o ectocisto enrugado ou ondulado e o endocisto com forma poligonal, estrelada ou arredondada. Além disso, verificaram que as duas paredes se uniam em pontos formando os ostíolos, que são os poros dos cistos. De Carli (2001) descreve trofozoítos com diâmetro de 15 a 45 μm e cistos entre 15 a 20 μm , além de vacúolos contráteis que desapareceram e reapareceram em intervalos irregulares de 45 a 50 segundos. Os achados do presente trabalho concordam com aqueles descritos acima, para caracterização do gênero *Acanthamoeba*, com exceção dos vacúolos contráteis que apresentaram tempos de contrações inferiores.

4.8. Reação em cadeia da polimerase das cepas axenizadas do gênero *Acanthamoeba*

Algumas amebas isoladas foram identificadas até o gênero *Acanthamoeba*, segundo os critérios morfológicos de Page (1988), bem como de acordo com dados da literatura, sendo confirmadas pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A dificuldade em se axenizar as amostras positivas para *Acanthamoeba* é um freqüente relato na literatura. No presente estudo isolamos 16 cepas sugestivas de pertencer ao gênero *Acanthamoeba*, mas apenas três cepas foram axenizadas em meio líquido PYG. Os principais

interferentes são fungos e bactérias, além disso, existem algumas cepas de *Acanthamoeba* que são mais difíceis de se multiplicar em meio PYG, com isso necessitando de meios mais enriquecidos (Shukla et al., 1990; Penland & Wilhelmus, 1997; Schuster, 2002). As cepas CZ4, B147 e RA9, foram axenizadas em meio PYG (Proteose peptona – levedo – Glicose), meio específico para *Acanthamoeba*. O DNA foi extraído por três métodos: extração através de choque térmico, com fenol (Mathers, 2000) e com tampão de lise contendo proteinase K (Khan et al., 2001). Entre os métodos testados, aquele em que obteve-se melhor rendimento de DNA e produtos de PCR, com bandas bem definidas após eletroforese em gel de agarose, foi o de Khan e colaboradores (2001), sendo por isso o método escolhido para a extração.

A partir da amplificação utilizando-se os oligonucleotídeos de Nelson (Mathers, 2000), obteve-se um fragmento com tamanho de 229 pb, (Figura 25), compatível com o esperado para o gênero *Acanthamoeba*. Tsvetkova e colaboradores (2004) isolaram 230 AVL de amostras de solo e água. Desses, 20 foram axenizadas em meio PYG. Os autores usaram a técnica da PCR para amplificar uma seqüência do 18S rDNA com 505 a 513 pb do gênero *Acanthamoeba*, confirmando 4 cepas para esse gênero.



FIGURA 25 - Produtos da PCR das cepas axenizadas CZ4, RA9 e B147 de *Acanthamoeba* spp., usando os oligonucleotídeos de Nelson. (1) controle água (controle negativo), (2) *Acanthamoeba castellanii* Neff (controle positivo), (3) cepa CZ4, (4) cepa RA9, (5) cepa B147, (6) *Escherichia coli* (controle negativo) e (7) marcador de peso molecular.

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

Entre as diversas seqüências de DNA que vêm sendo utilizadas para a identificação e taxonomia de uma série de organismos, aquelas que codificam os RNAs ribossômicos são as que vêm apresentando resultados mais promissores. No gênero *Acanthamoeba*, já foi determinado que a unidade de

repetição estaria em mais de 100 cópias por genoma (Byers et al., 1990; Stothard et al., 1999; Pasricha et al., 2003).

Mathers e colaboradores (2000), analisaram 117 pacientes para avaliação de ceratite por *Acanthamoeba* usando microscopia confocal, onde 31 pacientes eram suspeitos de estarem infectados pela ameba. O epitélio de cada paciente foi removido e submetido à técnica da PCR. Dos 31 pacientes, 24 confirmaram pela PCR a infecção por *Acanthamoeba*, em que os autores usaram oligonucleotídeos que amplificaram o gene ssu rDNA que codifica a subunidade menor 18S do ribossomo de 229 pb.

Com base na literatura consultada, este estudo parece ser o primeiro relato no RS da ocorrência de AVL potencialmente patogênicas em poeira e biofilmes de áreas críticas de um hospital. Os locais analisados abrigam pacientes de risco e essas amebas poderiam representar um potencial perigo para o desenvolvimento de doenças de difícil diagnóstico e alta letalidade, além de poderem veicular patógenos responsabilizados por casos graves de infecção nosocomial.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Amebas de vida livre, possivelmente do gênero *Acanthamoeba* foram isoladas de todos os ambientes hospitalares investigados, à exceção do Centro de Terapia Intensiva. Esses resultados indicam o elevado potencial patogênico daqueles ambientes, sobretudo da cozinha e dos bebedouros, os quais podem constituir importantes fontes de infecção hospitalar, tendo em vista o número de pacientes, familiares e profissionais que utilizam estes serviços.

É fundamental que as comissões de infecção hospitalar direcionem esforços para implantar medidas de higiene e desinfecção mais eficientes para o controle destes agentes, sobretudo nas épocas mais quentes do ano e naqueles ambientes onde prevalecem os biofilmes, fatores estes que demonstram maior importância quanto à ocorrência das AVL.

Os isolados como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* serão futuramente testados quanto a sua patogenicidade em animais de laboratório.

Os isolados que foram testados pela técnica da PCR poderão ter seu produto seqüenciado para confirmar o número de pares de base. E também realizar estudos usando enzimas de restrição com os isolados axenizados para avaliar polimorfismos no gênero.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S.N.; LAWANDE, R.V. Incidence of free-living amoebae in the nasal passages of local population in Zaria, Nigeria. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 85, p. 217–222, 1982.

ALVES, J.M.P. **Caracterização e filogenia moleculares de *Acanthamoeba***. 2001. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

ANZIL, A.P.; RAO, C.; WRZOLEK, M.A.; VISVESVARA, G.S.; SHER, J.H.; KOZLOWSKI, P.B. Amebic meningoencephalitis in a patient with AIDS caused by a newly recognized opportunistic pathogen: *Leptomyxid* amoeba. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, Chicago, v. 115, p. 21-25, 1991.

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

BEHETS, J.; SEGHI, F.; DECLERCK, P.; VERELST, L.; DUVIVIER, L.; VAN DAMME, A.; OLLIVIER, F. Detection of *Naegleria* spp. and *Naegleria fowleri*: a comparison of flagellation tests, ELISA and PCR. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 47, p. 117-122, 2003.

BERK, S.G.; TING, R.S.; TURNER, G.W.; ASHBURN, R.J. Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp.. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 5, p. 279–286, 1998.

BOTTONE, E.J. Free-living amebas of the genera *Acanthamoeba* e *Naegleria*: an overview and basic microbiologic correlates. **The Mount Sinai Journal Medicine**, New York, v. 60, n. 4, p. 260-270, 1993.

BRÜCKNER, D.; GARCIA, L.S. **Diagnostic Medical Parasitology**. 2. ed. Washington. American Society for Microbiology, 1993.

BYERS, T.J.; HUGO, E.R.; STEWART, V.J. Genes of *Acanthamoeba*: DNA, RNA and protein sequences (a review). **The Journal Protozoology**, Lawrence, v. 37, p. 175-255, 1990.

CARTER, R.F. Primary amoebic meningoencephalitis: Clinical pathological and epidemiological features of six fatal cases. **Journal of Pathology and Bacteriology**, Edinburgh, v. 96, p. 1-25, 1968.

CASEMORE, D.P., Free-living amoebae in home dialysis unit. **Journal Lancet**, Minneapolis, v. 2, p. 1078, 1977.

CHAPPELL, C.L.; WRIGHT, J.A.; COLETTA, M.; NEWSOME, A.L. Standardized method of measuring *Acanthamoeba* antibodies in sera from healthy human subjects. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 8, n. 4, p. 724-730, 2001.

CHARACKLIS, W.G. Biofilms processes. In: CHARACKLIS, W.G.; MARSHALL, K.C. **Biofilms**. New York: Wiley Preview, 1990.

CIRILLO, J.D.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L.S. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 8, p. 3254-3261, 1994.

CULBERTSON, C.G.; SMITH, J.W.; MINNER, J.R. *Acanthamoeba*: observation on animal pathogenicity. **Science Journal**, London, v. 127, p. 1506, 1958.

CURSONS, R.T.M.; BROWN, T.J.; KEYS, E.A. Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae: in axenic condition. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 40, n.1, p. 62-66, 1980.

DE CARLI, G.A. **Parasitologia Clínica: Seleção e Métodos e Técnicas de Laboratório para Diagnóstico das Parasitoses Humanas**. São Paulo: Atheneu, 2001.

DUNNEBACKE, T.H.; SCHUSTER, F.L.; YAGI, S.; BOOTON, G.C. *Balamuthia mandrillaris* from soil samples. **Microbiology**, Inglaterra, v. 150, p. 2837-2842, 2004.

DE JONCKHEERE, J.F. Ecology of *Acanthamoeba*. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 13, n. 5, p. 385-387, 1991.

FERRANTE, A.; BATES, E.J. Elastase in the pathogenic free-living amoebae *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp. **Infection Immunity**, Washington, v. 56, p. 3320-3321, 1988.

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

FICKER, L.; SEAL, D.; WARHURST, D.; WRIGHT, P. *Acanthamoeba* keratitis: resistance to medical therapy. **Eye**, London, v. 4, p. 835-838, 1990.

GAUTOM, R.K.; LORY, S.; SEYEDIRASHTI, S.; BERGERON, D.L.; FRITSCHÉ, T.R. Mitochondrial DNA fingerprinter of *Acanthamoeba* spp. isolated from clinical and environmental sources. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 4, p.1070 -1073, 1994.

GELMAN, B.B.; RAUF, S.J.; NADER, R.; POPOV, V.; BOKOWSKI, J.; CHALJUB, G.; NAUTA, H.W. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 285, p. 2450-2451, 2001.

GIAZZI, J.F. **Contribuição para o estudo do isolamento, cultivo e manutenção das amebas de vida livre**. 1996. 81 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1996.

GRIFFIN, J.L., Temperature tolerance of pathogenic and non pathogenic free-living amoebas. **Science Journal**, London, v. 178, p. 869–870, 1972.

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

HUANG, Z.H.; FERRANTE, A.; CARTER, R.F. Serum antibodies to *Balamuthia mandrillaris*, a free-living amoeba recently demonstrated to cause granulomatous amoebic encephalitis. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 179, p. 1305-1308, 1999.

ILLINWORTH, C. D., and COOK S.D. *Acanthamoeba* keratitis. **Survey of Ophthalmology**, Brookline, v. 42, p. 493-508, 1998.

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

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

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

KILVINGTON, S.; BEECHING, J. Identification and epidemiological typing of *Naegleria fowleri* with DNA probes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 6, p. 2071-2078, 1995.

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

KONG, H.-H.; CHUNG, D.-I. A ribotyping scheme for identification of unknown *Acanthamoeba* isolated at species level. **The Korean Journal of Parasitology**, Taegu, v. 40, n.1, p. 25-31, 2002.

KONG, H.-H.; SHIN, J.-Y.; YU, H.-S.; KIM, J.; HAHN, T.-W.; HAHN, Y.-H.; CHUNG, D.-I. Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism (RFLP) and 18S small-subunit ribosomal DNA PCR-RFLP analyses of *Acanthamoeba* isolated from contact lens storage cases of residents in southwestern Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 4, p. 1199-1206, 2002.

KONG, H.-H.; CHUNG, D.-I. PCR and RFLP variation of conserved region of small subunit ribosomal DNA among *Acanthamoeba* isolates assigned to either *A. castellanii* or *A. polyphaga*. **The Korean Journal of Parasitology**, Taegu, v. 34, n. 2, p. 127-134, 1996.

LEDEE, D.R.; HAY, J.; BYERS, T.J.; SEAL, D.V.; KIRKNESS, C.M. *Acanthamoeba griffini*. Molecular characterization of a new corneal pathogen. **Investigative Ophthalmology Visual Science**, Philadelphia, v. 37, p. 544-550, 1996.

MA, P.; WILLAERT, E.; JUECHTER, K.B.; STEVENS, A.R. A case of keratitis due to *Acanthamoeba* in New York, New York, and features of 10 cases. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 143, n.5, p. 662-667, 1981.

McMILLAN, A. Laboratory Diagnostic Methods and Cryopreservation of Trichomonas. In: HONIGBERG, B.M. **Trichomonads Parasitic in Humans**. New York: Springer-Verlag, 1989.

MARTINEZ, A.J.; JANITSCHKE, K. *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism: a review. **Infection**, Munchen, v. 13, p. 251-256, 1985.

MARTINEZ, A.J. Free-living amebas: infection of the central nervous system. **The Mount Sinai Journal Medicine**, New York, v. 60, p. 271-278, 1993.

MATHERS, W.D.; NELSON, S.E.; LANE, J.L.; WILSON, M.E.; ALLEN, R.C.; FOLBERG, R. Confirmation of confocal microscopy diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using polymerase chain reaction analysis. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 118, n. 2, p.178 -183, 2000.

MOLMERET, M.; HORN, M.; WAGNER, M.; SANTIC, M.; KWAIK, Y.A. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 1, p. 20-28, 2005.

MORALES, J.L.; RIVAS, A.O.; FORONDA, P.; MARTÍNEZ, E.; VALLADARES, B. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. **Parasitology Research**, Berlin, v. 95, p. 273-277, 2005.

MURAKAWA, G.J.; MCCALMONT, T.; ALTMAN, J.; TELANG, G.H.; HOFFMAN M.D.; KANTOR G.R.; BERGER, T.G. Disseminated acanthamebiasis in patients with AIDS. **Archives of Dermatology**, New York, v. 131, p.1291-1296, 1995.

NEU, T.R.; VAN DER MEI, H.C.; BUSSCHER, H.J. Biofilms associated with health. In: MELO, L.F. et al. **Biofilms: Science and Technology**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992.

NEWSOME, A.L.; SCOTT, T.M.; BENSON, R.F.; FIELDS, B.S. Isolation of an amoeba naturally harboring a distinctive *Legionella* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 5, p. 1688-1693, 1998.

PAGE, F.C. **A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae**. Ambleside: Freshwater Biological Association, 1988.

PASRICHA, G.; SHARMA, S.; GARG, P.; AGGARWAL, R.K. Use of 18S rRNA gene-based PCR assay for diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers in India. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 7, p. 3206-3211, 2003.

PÉLANDAKIS, M.; DE JONCKHEERE, J.F.; PERNIN, P. Genetic variation in the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n.8, p. 2977-2981, 1998.

PÉLANDAKIS, M.; PERNIN, P. Use of multiplex PCR restriction enzyme analysis for detection and exploration of the variability in the free-living amoeba *Naegleria* in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 4, p. 2061-2065, 2002.

PENLAND, R.L.; WILHELMUS, K.R. Comparison of axenic and monoxenic media for isolation of *Acanthamoeba*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 4, p. 915-922, 1997.

PERNIN, P.; PÉLANDAKIS, M.; ROUBY, Y.; FAURE, A.; SICLET, F. Comparative Recoveries of *Naegleria fowleri* Amoebae from Seeded River Water by Filtration and Centrifugation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 3, p. 955-959, 1998.

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

RIVIÈRE, D.; SZCZEBARA, F.M.; BERJEAUD, J.-M.; FRÈRE, J.; HÉCHARD, Y. Development of a real-time PCR assay for quantification of *Acanthamoeba* trophozoites and cysts. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, p. 1-6, 2005.

ROHR, U.; WEBER, S.; MICHEL, R.; SELENKA, F. WILHELM, M. Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 5, p. 1822-1824, 1998.

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E.F.; MANIATS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAWYER, T.K. Free-living pathogenic and nonpathogenic amoebae in Maryland soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 5, p. 1074-1077, 1989.

SCHUSTER, F.L. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.15, n. 3, p. 342-354, 2002.

SCHUSTER, F.L.; VISVESVARA, G.S. Axenic growth and drug sensitivity studies of *Balamuthia mandrillaris*, an agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, p. 385-388, 1996.

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

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

SHEEHAN, K.B.; FAGG, J.A.; FERRIS, M.J.; HENSON, J.M. PCR detection and analysis of the free-living amoeba *Naegleria* in hot springs in Yellowstone and Grand Teton National Parks. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n.10, p. 5914-5918, 2003.

SHUKLA, O.P.; KAUL, S.M.; MEHLOTRA, R.K. Nutritional studies on *Acanthamoeba culbertsoni* and development of chemically defined medium. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 37, n. 3, p. 237-242, 1990.

SILVA, M.A. **Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de poeira de hospitais da cidade de Presidente Prudente**. 2001. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

SILVA, M.A.; ROSA, J.A. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênica em poeira de hospitais. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.37, n. 2, p. 242-246, 2003.

SIMMONS, P.A.; TOMLINSON A.; SEAL, D.V.; The role of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in the attachment of *Acanthamoeba* to four types of hydrogel contact lens material. **Optometry and Vision Science**, Fullerton, v. 75, p. 860–866, 1998.

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

STEVENS, A.R.; TYNDALL, R.L.; COUTANT, C.C.; WILLAERT, E. Isolation of the etiological agent of primary amoebic meningoencephalitis from artificially heated waters. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 34, n. 6, p. 701-705, 1977.

STOTHARD, D.R.; HAY, J.; SCHROEDER-DIEDRICH, J.M.; SEAL, D.V.; BYERS, T.J. Fluorescent oligonucleotides probes for clinical and environmental detection of *Acanthamoeba* and the T4 18S rRNA gene sequence type. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 8, p. 2687-2693, 1999.

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

VISVESVARA, G.S.; MARTINEZ, A.J.; SCHUSTER, F.L.; LEITCH, G.J.; WALLACE S. V.; SAWYER, T.K.; ANDERSON, M. *Leptomyxid* ameba, a new agent of amoebic meningoencephalitis in humans and animals. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, p. 2750-2756, 1990.

VISVESVARA, G.S.; STEHR-GREEN, J. K., Epidemiology of free-living ameba infections, **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 37, p. 25S-33S, 1990.

WALOCHNIK, J.; HALLER-SHOBER, E.-M.; KÖLLI, H.; PICHER, O.; OBWALLER, A.; ASPÖCK, H. Discrimination between clinically relevant and nonrelevant *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens-wearing keratitis patients in Austria. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 11, p. 3932-3936, 2000.

7. ANEXOS

Soluções

Meio de Page (Solução Salina para Ameba):

Cloreto de Sódio (NaCl)	120 mg
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄ . 7 H ₂ O)	4 mg
Hidrogenofosfato dissódico anidro (Na ₂ HPO ₄)	142 mg
Diidrogenofosfato de Potássio (KH ₂ PO ₄)	136 mg
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂ . H ₂ O)	4 mg
Água destilada – deionizada	1000 mL

Preparação

Dissolver os ingredientes em água destilada-deionizada na ordem apresentada em recipiente apropriado. Distribuir nos volumes requeridos (100mL) em 10 frascos de vidro. Autoclavar (121°C/15min) Incubar o meio durante a noite, a 37°C, para teste de esterilidade. Armazenar o meio à temperatura de 4 - 5°C até três meses.

Solução criopreservadora a 5% (V/V)

Dimetilsulfóxido (DMSO) [(CH ₃) ₂ SO ₄]	5,0 mL
Meio PYG	95,0 mL

Meios de cultivo

Ágar não – Nutritivo:

- Solução Salina de Page 100mL
- Ágar 1,5 g

Preparação das placas

Dissolver o ágar em 100mL na solução salina de Page, aquecer em banho de água até a completa dissolução. Distribuir o meio em tubos com rosca, autoclavar (121 °C/15min). Distribuir em condições de assepsia em placas de Petri de plástico estéreis (5mL em placas de 60 x 15 mm).

Meio Proteose Peptone* - Extrato De Levedo - Glicose (PYG)

para *Acanthamoeba* spp.; pH 6,5 ± 0,2.

- Polipeptona* (Digesto pancreático de caseína) 7,5g**
- Extrato de levedo 0,75g**
- Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.98g
- Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,098g
- Citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1g
- Sulfato ferroso amoniacal [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$] 0,02g

- Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) 0,034g
- Hidrogenofosfato dissódico anidro 0,355g
- Glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) 15g**
- Água destilada 1000mL

* Foi substituído.

**Foi alterada a concentração.

Preparação

Dissolver todos componentes, com exceção do CaCl_2 em 900mL de água destilada. Adicionar o CaCl_2 até a completa dissolução. Distribuir em vidro de Duran® e autoclavar (121°C/15 min).

Fixador de Shaudinn modificado (Bruckner,1993):

1) Solução de Sulfato de Cobre:

- Sulfato de cobre II. $5\text{H}_2\text{O}$ 20g
- Água destilada – deionizada 1000mL

2) Solução estoque:

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

Armazenar até o momento do uso.

3) Solução fixadora:

- Solução estoque 100 mL
- Ácido acético glacial 5 mL

Adicionar o ácido acético, imediatamente antes do uso.

Coloração de tricrômico de Wheatley modificado por Gomori

(Bruckner, 1993):

Tricrômico:

- Cromotrope 2R 0,6 g
- “Light green” SF 0,3 g
- Ácido fosfotúngstico 0,7 g
- Ácido acético glacial 1,0 mL
- Água destilada 100mL

Após fixadas as lâminas foram tratadas como segue:

- Álcool 70% durante 5 min.
- Álcool 70% iodado 1 min.
- Álcool 70% 5 min.
- Álcool 70% 3 min.
- Tricrômico 13 min.
- Álcool 90% acidificado por 1 a 3 segundos.
- Álcool 100% para limpar.
- Álcool 100% em duas cubas 3 min em cada.

- Xileno durante 10 minutos.

Tampão de lise (Khan et al, 2001):

100 mM KCl	0,3 mL	
40 mM Tris	0,12mL	
5 mM MgCl ₂	0,3 mL	
Twen 1%	0,03 mL	
200 µg/mL Proteinase K	0,6 mg	
Água destilada q.s.p.		3,0 ml

