

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

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Acanthamoeba* spp. PRESENTE EM CÃES
DA CIDADE DE PORTO ALEGRE-RS**

TESE DE DOUTORADO

ANA MARIS CARLESSO

**Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Marilise Brittes Rott
Co-orientador: Prof^ª. Dr^ª. Márcia Bohrer Mentz**

**Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Março 2014**

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

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Acanthamoeba* spp. PRESENTE EM CÃES
DA CIDADE DE PORTO ALEGRE-RS**

Ana Maris Carlesso

Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - UFRGS

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Dra. Marilise Brittes Rott

Co-orientador: Prof^ª. Dr^ª. Márcia Bohrer Mentz

Porto Alegre, RS, Brasil

Março, 2014

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas e da Saúde da UFRGS, sendo financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Acanthamoeba* spp. PRESENTE EM CÃES DA CIDADE DE PORTO ALEGRE-RS¹

Ana Maris Carlesso

Orientadora: Dra. Marilise Brittes Rott

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Márcia Bohrer Mentz

RESUMO

Protozoários do gênero *Acanthamoeba* estão presentes nos mais variados ambientes, sendo esta a ameba mais isolada entre as amebas de vida livre (AVL). *Acanthamoeba* spp. pode causar encefalomielite e outras doenças graves em animais e seres humanos. Os fatores que contribuem para infecções por *Acanthamoeba* incluem biologia parasitária, diversidade genética, propagação no meio ambiente e suscetibilidade do hospedeiro. *Acanthamoeba* pode hospedar diversos microrganismos como: algas, bactérias, fungos, protozoários e vírus. Os estudos sobre as interações entre *Acanthamoeba* e microrganismos tem aumentado nos últimos anos, principalmente para entender como certas bactérias resistem à fagocitose de seus hospedeiros. Existem poucos estudos sobre adesão e a interação *in vitro* de *Acanthamoeba* com macrófagos, que são a primeira linha de defesa em doenças infecciosas. Neste trabalho foi proposto o isolamento de AVL do gênero *Acanthamoeba* de amostras clínicas de cães. Os resultados deste trabalho foram: 14 isolados de *Acanthamoeba* confirmados pela PCR, sendo o alvo o gene do 18S rDNA, de mucosa nasal e lesões cutâneas de 96 amostras coletadas de 48 cães. Destes, 13 isolados de *Acanthamoeba* foram sequenciados, o genótipo foi determinado e o potencial de patogenicidade em células VERO de 8 isolados foi avaliado. Os isolados eram pertencentes aos genótipos T3 (3 amostras), T4 (5 amostras), T5 (4 amostras) e T16 (1 amostra). Os 14 isolados de *Acanthamoeba* continham pelo menos uma espécie bacteriana internalizada e um isolado continha todas as espécies de endossimbiontes pesquisados. Observou-se que 79% dos isolados de *Acanthamoeba* hospedavam *Legionella pneumophila*, 50% *Mycobacterium*, 79% *Pseudomonas* e 57% Enterobacteriaceae. Os isolados de *Acanthamoeba* foram co-cultivados com macrófagos e observou-se à aderência em apenas 1h de contato, confirmando que *Acanthamoeba* é contato dependente. Este estudo descreveu os primeiros isolados de *Acanthamoeba* de amostras clínicas provenientes de cães. Também foi o primeiro relato da presença de endossimbiontes neste tipo de isolado realizado na América Latina. Neste estudo foi isolado pela primeira vez o genótipo T16 de amostra clínica. A importância deste estudo está no fato de verificar a presença de *Acanthamoeba* potencialmente patogênica em amostras clínicas de animais e pesquisar bactérias patogênicas internalizadas nestas amebas. Podendo estes microrganismos estar envolvidos em doenças infecciosas e futuras complicações como doenças graves em mamíferos.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (81p.) Março, 2014.

CHARACTERIZATION OF ISOLATES OF *Acanthamoeba* FROM THE NASAL MUCOSA AND CUTANEOUS LESIONS OF DOGS¹

Ana Maris Carlesso

Orientadora: Dra. Marilise Brittes Rott

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Márcia Bohrer Mentz

ABSTRACT

Protozoa of the genus *Acanthamoeba* are present in diverse environments and are the most common free-living amoeba (FLA). *Acanthamoeba* spp. cause encephalitis and can cause severe illness in animals and humans. The factors that contribute to infections include *Acanthamoeba* parasite biology, genetic diversity, spreading in the environment and host susceptibility. *Acanthamoeba* may host various microorganisms such as algae, bacteria, fungi, protozoa and viruses. Studies regarding the interactions between *Acanthamoeba* and microorganisms have increased in recent years, mainly to understand how certain bacteria resist phagocytosis by their hosts. There are few studies on adherence and in vitro interaction of *Acanthamoeba* with macrophages, which are the first line of defense in infectious diseases. In this study, we proposed the isolation of the FLA *Acanthamoeba* from clinical samples from dogs. We found 14 *Acanthamoeba* isolates confirmed by PCR and by the 18S gene target rDNA in nasal mucosa and skin lesions out of 96 samples collected from 48 dogs. From this 14 isolates, 13 *Acanthamoeba* isolates were sequenced and the genotype was determined. Regarding the potential for pathogenicity in VERO cells, 8 isolates was assessed. The isolates belonged to genotype 3 (3 samples), T4 (5 samples), T5 (4 samples) and T16 (1 sample). The 14 isolates of *Acanthamoeba* contained at least one bacterial species internalized and one isolate contained all endosymbionts species studied. It was observed that 79% of isolates of *Acanthamoeba* carrying *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* 50%, 79% *Pseudomonas* and 57% Enterobacteriaceae. *Acanthamoeba* isolates were co-cultured with murine macrophages and adherence was observed in 1h of contact, confirming that *Acanthamoeba* interact with defense cells in a contact-dependent manner. This study describes the first clinical isolates of *Acanthamoeba* samples from dogs. It was also the first report of the presence of this type of endosymbionts isolated held in Latin America. As far as we know, this is the first study to isolate a T16 genotype amoeba from clinical sample. The importance of this study lies on the fact verify the presence of potentially pathogenic *Acanthamoeba* in samples from animals and search pathogenic bacteria internalized by these amoebae. These microorganisms may be involved in infectious diseases in mammals.

¹Doctoral thesis in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (81p.) March, 2014.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	<u>1</u>
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Amebas de vida livre potencialmente patogênicas	3
2.2. Histórico de <i>Acanthamoeba</i> spp.	5
2.2.1. Morfologia, ciclo de vida e cultivo in vitro de <i>Acanthamoeba</i> spp.	6
2.2.2. Ecologia do gênero <i>Acanthamoeba</i> spp..	8
2.2.3. Classificação e taxonomia de <i>Acanthamoeba</i> spp	9
2.2.3.1. Classificação baseada na morfologia dos cistos	9
2.2.3.2. Classificação do gênero <i>Acanthamoeba</i> spp pelo sequenciamento	10
2.2.3.3. Taxonomia atual do gênero <i>Acanthamoeba</i> spp.	11
2.2.4. Infecções causadas por <i>Acanthamoeba</i> spp.	12
2.2.4.1. Encefalite amebiana granulomatosa (EAG)	12
2.2.4.2. Diagnóstico de <i>Acanthamoeba</i> spp. na EAG	13
2.2.4.3. Tratamento de EGA	14
2.2.4.4. Lesões cutâneas por <i>Acanthamoeba</i> spp.	16
2.2.4.5. Ceratite por <i>Acanthamoeba</i> spp.	17
2.2.4.6. Diagnóstico e tratamento de ceratite por <i>Acanthamoeba</i> spp.	18
2.2.5. Patogênese de <i>Acanthamoeba</i> spp.	20
2.2.6 <i>Acanthamoeba</i> em animais	21
2.2.7. Citopatogenicidade <i>in vitro</i> de <i>Acanthamoeba</i> spp.	22
2.2.8. Interação de <i>Acanthamoeba</i> spp. com macrófagos.	23
2.2.9. Microrganismos Resistentes a <i>Acanthamoeba</i> (MRA)	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
CAPÍTULO I	33
CAPÍTULO II	39
CAPÍTULO III	52
4. DISCUSSÃO GERAL	66
5. CONCLUSÕES	69
6.PERSPECTIVAS	71

7. ANEXOS	72
ANEXO 1	72
ANEXO 2	73
8. REFERÊNCIAS	75

LISTA DE TABELAS

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
<hr/>	
CAPÍTULO I	33
<hr/>	
Table 1. Genotypic characterization of isolates found in dogs in RS, Brazil	33
Table 2. Behavior of <i>Acanthamoeba</i> isolated from skin lesion and nasal mucosa of dogs at different temperatures and osmolarities	33
CAPÍTULO II	39
<hr/>	
Table 1. Oligonucleotides. Oligonucleotides sequences used in PCR	45
Table 2. Genotypic characterization of isolates found in dogs in RS Brazil. Endosymbionts	52

LISTA DE FIGURAS

<u>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	3
Figura 1. Trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> isolados das amostras clínicas de cães, como resultado da presente tese	7
Figura 2. Cisto de <i>Acanthamoeba</i> isolado de amostras clínicas de cães, como resultado da presente tese. Coloração de Gram.	7
Figura 3. Árvores dos eucariontes proposta pela Sociedade Internacional de Protoz.	12
Figura 4. Secção coronal dos hemisférios cerebrais com cortical e necrose subcortical de um caso humano fatal de GAE.	15
Figura 5. Vários trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> em meio a restos necróticos da biópsia de abscesso da pele.	16
Figura 6. Lesões cutâneas ulceronecroticas por <i>A. spp.</i> em paciente com HIV.	16
Figura 7. Ceratite por <i>A. spp.</i>	17
Figura 8. Microscopia de transmissão: <i>A. castellanii</i> do grupo T4 e macrófago alveolar	24
<u>CAPÍTULO I</u>	<u>33</u>
Figure 1. Cytopathic effect of <i>Acanthamoeba</i> isolates from nasal mucosa and lesion of dogs on VERO.	36
<u>CAPÍTULO II</u>	<u>39</u>
Figure 1. <i>Acanthamoeba</i> strains isolated from dogs with Gram negative bacteria therein.	51
Figure 2. <i>Legionella pneumophila</i> PCR amplification. The DNA obtained from the whole organism of <i>Acanthamoeba</i> samples were amplified for the gene <i>mip gene</i> .	53
Figure 3. <i>Mycobacterium</i> PCR amplification. The DNA obtained from the whole organism of <i>Acanthamoeba</i> samples were amplified for the gene <i>hsp65 gene</i> .	53
Figure 4. <i>Pseudomonas</i> PCR amplification. The DNA obtained from the whole organism of <i>Acanthamoebae</i> samples were amplified for the gene <i>R16S gene</i> .	54

Figure 5. *Enterobacteriaceae* PCR amplification. The DNA obtained from the whole organism of *Acanthamoeba* samples were amplified for the gene *csgA* gene. 54

CAPÍTULO III 59

Figure 1. Number of absolute amoebae adhered with macrophages in 1h of incubation 32°C a 5% of CO₂. 64

Figure 2. Giemsa staining: Adherence of macrophages with *Acanthamoeba*. (a) trophozoites of *Acanthamoeba* adhered to the macrophage. 65

1 INTRODUÇÃO

Acanthamoeba é uma das amebas de vida livre (AVL), potencialmente patogênica e oportunista, mais isolada do meio ambiente e que pode causar infecções em humanos e animais. AVL do gênero *Acanthamoeba* são protozoários eucariontes, mitocôndriados e aeróbicos que contém numerosos vacúolos.

A interação *Acanthamoeba*-bactéria ganhou importância nos últimos anos, com a observação de que vários microrganismos endossimbiontes ou patógenos resistem e sobrevivem no interior de vacúolos de trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba*. Estas associações facilitariam a entrada de microrganismos em hospedeiros suscetíveis, nos quais este protozoário funcionaria como “cavalo de Tróia”. A semelhança morfológica entre *Acanthamoeba* e macrófagos na capacidade de capturar presas por fagocitose e nas interações com patógenos microbianos, facilitaria ainda mais as infecções pelos microrganismos em humanos e animais.

Acanthamoeba pode estar associada a graves infecções em mamíferos, atuando como um parasito. A via de entrada desta ameba nos organismos, geralmente dá-se pela mucosa nasal ou lesões de pele, podendo afetar a região da nasofaringe, pele, pulmões e sistema nervoso central (SNC). A infecção no SNC é conhecida como Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) e ocorre via hematogênica ou disseminação pulmonar. *Acanthamoeba* também pode causar uma doença invasiva nos olhos conhecida como ceratite amebiana.

Nos últimos anos surgiram relatos de casos de infecções agudas e crônicas no SNC por *Acanthamoeba* em cães imunocompetentes e imudeprimidos. Acantamebíases em pulmões, coração, fígado, pâncreas e SNC já foram observados em outras espécies animais como pássaros, macaco, canguru, touro, equino e búfalo. As doenças do SNC causadas pelo referido gênero, são

infecções graves que quase sempre levam à morte e apresentam sintomas neurológicos semelhantes em seres humanos e animais.

No Brasil, diversas pesquisas têm sido realizadas, no sentido de isolar e caracterizar *Acanthamoeba* a partir de diversos ambientes. Entretanto, até o momento *Acanthamoeba* não foi isolada de animais em nosso país e nem na América Latina.

Assim, o presente estudo é pioneiro no Brasil e dados epidemiológicos relativos à *Acanthamoeba* spp. Isolada de animais, são necessários, para melhor entendimento da distribuição, estabelecimento de diagnósticos e tratamentos precoces, além de adoção de medidas preventivas adequadas para controle das infecções causadas por este protozoário. Baseado nisso o objetivo deste estudo foi. Identificar e caracterizar protozoários do gênero *Acanthamoeba* spp. isolados da mucosa nasal e de lesões cutâneas de cães da cidade de Porto Alegre. Os objetivos específicos deste estudo foram:

1. Realizar o isolamento de AVL em meio monoxênico e clonagem dos isolados para obtenção de cultura pura;
2. Realizar a axenização dos isolados obtidos, utilizando meio PYG (Peptona, extrato de leveduras e glicose);
3. Caracterizar molecularmente os isolados de *Acanthamoeba* spp utilizando a técnica de PCR com oligonucleotídeos específicos para o gene 18S rRNA e posterior sequenciamentos;
4. Realizar estudos relativos à citopatogenicidade dos isolados obtidos utilizando linha celular de mamíferos (VERO);
5. Avaliar o comportamento dos macrófagos frente aos isolados de *Acanthamoeba* spp.;
6. Investigar a presença de Bactérias Resistentes a Amebas (BRA) nos isolados obtidos através da técnica da PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para cada gene de diferentes bactérias.

2. REVISÕES BIBLIOGRÁFICAS

2.1 Amebas de vida livre potencialmente patogênicas

Amebas de vida livre (AVL) são protozoários amplamente distribuídos no ambiente, isolados do ar, solo, água, lentes de contato, unidades de ar-condicionados, entre outros. (Khan, 2006) As AVL que causam patologias como encefalites, ceratites, infecções de pulmões, de pele e infecção generalizada, em humanos e animais são algumas espécies dos gêneros: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* e *Sappinia* (De Jonckheere 2002; Marciano-Cabral e Cabral 2003; Schuster e Visvesvara, 2004a). Além disso, as AVL são consideradas veículos de microrganismos patogênicos como: *Legionella pneumophila*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium* spp. entre outros (Martinez e Visvesvara 1997; Schuster et al. 2003, Greub e Raoult 2004).

As AVL, também chamadas de amebas anifzóicas, estão livres no meio ambiente e como organismos oportunistas, invadem e coloniza hospedeiros suscetíveis (Marciano-Gabral, 2003; Visvesvara, 2010). Os fatores importantes para o estabelecimento da infecção por AVLs em seres humanos e animais são: capacidade de sobreviver e proliferar na temperatura do hospedeiro, de persistir nas mucosas, dose infectante e fenômenos associados à imunodeficiência do hospedeiro, (Khan 2006; Visvesvara *et al.*, 2007).

O primeiro caso de meningoencefalite amebiana primária (MAP) em seres humanos, envolvendo AVL foi descrito na Austrália por Fowler e Carter (1965) que nomearam a ameba de *Naegleria fowleri*. Entre as trinta espécies descritas do gênero *Naegleria*, apenas *N. fowleri* é o agente de Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP), infecção aguda hemorrágica e fulminante que causa a morte de indivíduos saudáveis em poucos dias (média de 6 dias). Já foram relatados mais de 200 casos no mundo, em sua maioria, de crianças e adolescentes com histórico de ter nadado ou estado em contato recente com água contaminada (Schuster e Visvesvara, 2004b).

N. fowleri já foi isolada de bovinos e antas que beberam água de superfície não tratada e contaminada pela ameba. Daft e colaboradores (2005) atribuíram à *N. fowleri*, a morte de nove novilhas em uma região da Califórnia (USA). Os autores relataram que esse foi o primeiro caso de *N. fowleri* em bovinos e que os sinais e sintomas de MAP eram muito semelhantes aos de seres humanos, assim como o modo de infecção.

Espécies do gênero *Acanthamoeba* spp. e a espécie *Balamuthia mandrillaris* são causadores de EAG, de infecções pulmonares e de pele, que acometem principalmente indivíduos imunodeprimidos. O primeiro caso de uma infecção fatal por encefalite causada por *B. mandrillaris* foi identificado por Visvesvara e colaboradores (1990) em uma macaca mandril do zoológico de San Diego – EUA. *B.mandrillaris* já foi isolada de cavalos, ovelhas, gorilas e só recentemente Dunnebacke e colaboradores (2004), isolaram *B. mandrillaris* pela primeira vez do meio ambiente (Visvesvara *et al.*, 1990; Fuentealba *et al.*, 1992; Kinde *et al.*, 2007). Esta ameba também foi identificada em um paciente com AIDS, além de crianças e idosos imunocompetentes perfazendo mais de 100 casos de encefalite por *B. mandrillaris* no mundo (Schuster e Visvesvara, 2004b, Foreman *et al.*, 2004).

Acanthamoeba spp. também provoca uma grave doença que compromete a visão (ceratite), que incide principalmente em usuários de lentes de contato (Radford *et al.* 2002). Recentemente, *Sappinia diploidea*, uma AVL normalmente encontrada em solo contaminado com fezes de alces, bisões e bovinos, foi identificada como a espécie causadora de um único caso de encefalite em um ser humano imunocompetente que sobreviveu (Gelman *et al.*, 2001). Outras AVLS como *Vahlkampfia*, *Hartemannella* e *Vanella* foram também descritas em ceratites humanas (Aitken *et al.*, 1996, Schuster e Visvesvara, 2004).

Devido ao diagnóstico ser feito geralmente *post-mortem* ou após a perda da visão e das dificuldades na identificação de infecções causadas por AVL, muitos casos de encefalite e ceratite

em seres humanos e animais, podem estar sendo subestimados, principalmente em países em desenvolvimento (Khan, 2006).

2.2 Históricos do gênero *Acanthamoeba* spp.

Em 1913 Puschckarew isolou uma ameba de poeira e nomeou de *Amoebae polyphagus*. Page em 1967 a reescreveu como *Acanthamoeba polyphaga* mantendo *Acanthamoeba* como gênero criado por Volkonsky em 1931. Em 1930 Castellani isolou uma ameba como contaminante em cultura de leveduras e mais tarde esta ameba foi nomeada *Acanthamoeba castellanii*.

Culbertson e colaboradores (1958) observaram na produção de vacinas para poliomelite, a contaminação de culturas celulares por amebas. Culbertson em 1971 confirmou a patogenicidade deste protozoário inoculando uma cultura contaminada com amebas em ratos e macacos. Os animais morreram em uma semana de encefalite, consequência da invasão disseminada de trofozoítos. Até então esta ameba era considerada saprofítica e não patogênica. Subsequentemente o isolado foi nomeado *Acanthamoeba culbertsoni*. Culbertson criou a hipótese de que AVLs poderiam causar infecção em seres humanos (Schuster e Visvesvara, 2004, Visvesvara *et al.*, 2007).

Em 1972, Jager e Stamm registraram a primeira EGA humana por *Acanthamoeba*. Martinez (1982) caracterizou a infecção como oportunista, porque a doença aconteceu em um paciente debilitado. No mesmo caso, o autor distinguiu as patologias causadas por *Acanthamoeba* e *Naegleria*. A primeira ceratite por *Acanthamoeba* em seres humanos (geralmente imunocompetentes) foi detectada em 1974 no Reino Unido (Naginton *et al.*, 1974) e nos Estados Unidos por Jones *et al.* (1975). A partir daí, outros casos têm sido descritos em diversas partes do mundo, sendo estimados até então, 200 casos de encefalites e 3000 de ceratites por *Acanthamoeba* (Yoder *et al.*, 2012).

2.2.1. Morfologia e ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp.

Acanthamoeba apresentam duas formas evolutivas (Figura 1) os trofozoítos que são formas multiplicativas, de locomoção (movimentos polidirecionais através da emissão de pseudópodes globosos e hialinos, de onde surgem finos pseudópodes semelhantes a espinhos, chamados de acantopódios) e de nutrição (principalmente pela fagocitose de bactérias, algas, fungos, leveduras, matéria orgânica ou por inclusão de partículas líquidas) e os cistos (Figura 2) que são formas de resistência que favorecem a perpetuação e a dispersão dos organismos no ambiente (Page, 1988; Schuster & Visvesvara, 2004; Lorenzo-Morales *et al.*, 2013).

Os cistos apresentam três formas morfológicas: estrelado, poligonal e arredondado (Pussard e Pons 1977). Cistos de *Acanthamoeba* spp. são resistentes a uma variedade de adversidades, como: variações de temperaturas, congelamento, radiação ultravioleta, cloro, herbicidas e pesticidas (Siddiqui e Khan, 2012).

Acanthamoeba spp. não necessita de um hospedeiro para completar o seu ciclo de vida, sendo parasito facultativo ou oportunista. São definidas como anfitriônicas devido a sua capacidade de existir normalmente como organismos de vida livre e de sobreviver ou causar infecções em tecidos de seres humanos e outros animais (Visvesvara *et al.*, 2007).

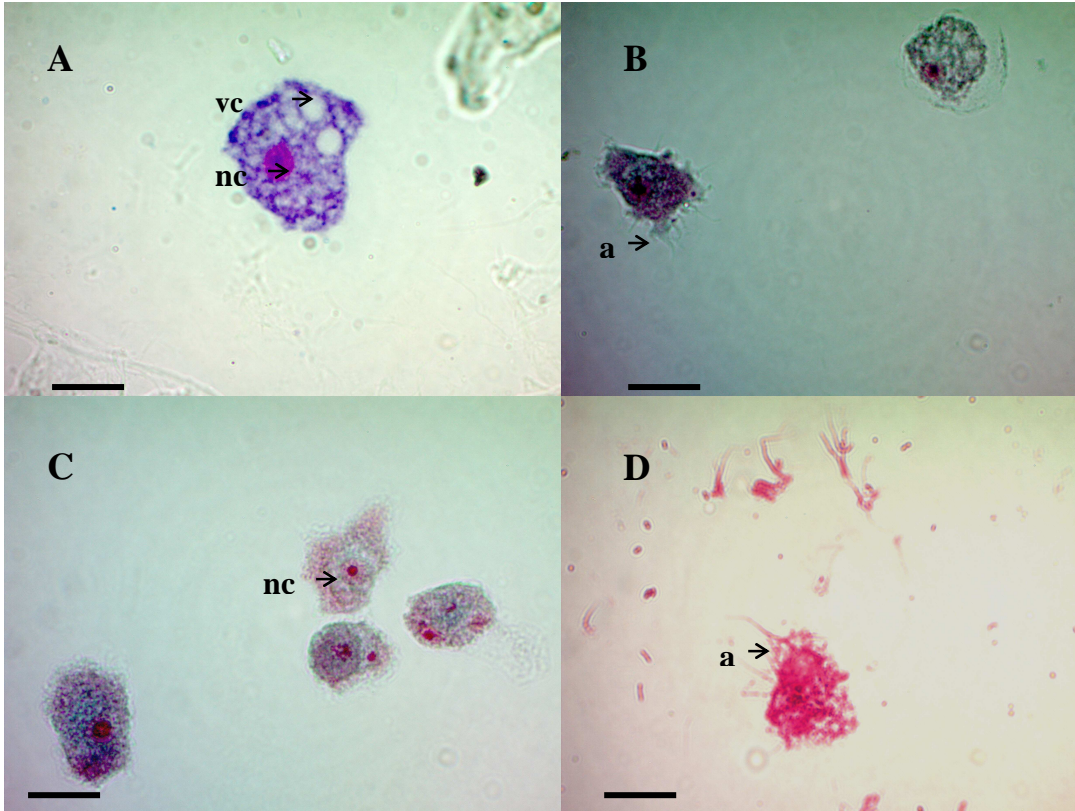


Figura 1. Trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. isolados das amostras clínicas de cães, como resultado da presente tese. (A) coloração de Giemsa, (vc) vacúolo contrátil. (B, C) coloração de tricrômico. (D) coloração de Gram. Aumento de 1000X. Barra = 5 µm. Nota-se no trofozoíto a presença das expansões citoplasmáticas em forma de espinhos – acantopódios (a); núcleo (n). Observa-se o nucléolo marcante (nc) e a presença de vacúolo contrátil (vc). Fonte: Ana Maris Carlesso, 2014.

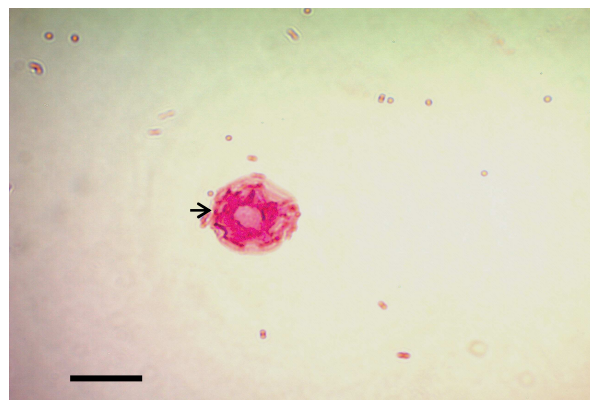


Figura 2. Cisto de *Acanthamoeba* spp. isolado de amostras clínicas de cães como resultado da presente tese. Coloração de Gram. Cisto com a presença da parede dupla (seta). Fonte: Ana Maris Carlesso, 2014.

2.2.2.1. Ecologia do gênero *Acanthamoeba* spp.

Protozoários do gênero *Acanthamoeba* spp. estão presentes nos mais variados ambientes (é a ameba mais comum das AVL) e tem sido isolada de solo, poeira, plantas (bromélias), fontes naturais de água, reservatórios de água, água do mar, água de torneira, água mineral de garrafa, água de piscinas, hidromassagem, soluções de lentes de contato, esgoto, amostras de ar atmosférico, sistemas centrais de ar condicionado, ambientes hospitalares (máquinas de diálise) e equipamentos dentários. E também em uma grande variedade de organismos, incluindo insetos (*Aedes aegyptis*), peixes, répteis, pássaros, mamíferos (seres humanos, gorilas, cangurus, bovinos, equinos, cães, gatos, etc.), (Marciano-Cabral & Cabral, 2003, Schuster e Visvesvara, 2004a Khan, 2006, Visvesvara *et al.*, 2007, Sriram, *et al.*, 2008; Caumo *et al.* 2009; Magliano *et al.*, 2009 ; Carlesso *et al.*, 2010; Winck *et al.*, 2011; Otta *et al.*, 2012).

A abundância destas amebas e a diversidade no ambiente depende da estação do ano, da temperatura, da umidade, do pH, da salinidade e de nutrientes disponíveis como bactérias, leveduras, fungos e algas (Schuster e Visvesvara, 2004b Carlesso *et al.*, 2010).

Em seres humanos *Acanthamoeba* foi isolada de mucosa nasal de voluntários saudáveis (Vilchez *et al.*, 2013) e pacientes com complicações respiratórias, secreção pulmonar, ouvido, seio maxilar, auto-transplante mandibular, cérebro, pulmão, pele, córnea e amostras de fezes (Schuster e Visvesvara, 2004; Visvesvara *et al.*, 2007). A ampla distribuição de *Acanthamoeba* no ambiente, também foi evidenciada pelos achados de anticorpos na população humana e animal, confirmando um maior contato com esta ameba em diversos ambientes. (Schuster e Visvesvara, 2004).

2.2.3 Classificação e taxonomia de *Acanthamoeba* spp.

2.2.3.1. Classificação baseada na morfologia dos cistos

A classificação do gênero *Acanthamoeba* inicialmente baseou-se em critérios morfológicos que consideravam o tamanho e a forma dos cistos. A classificação proposta por Pussard e Pons (1977), subdividiu o gênero em três grupos morfológicos distintos (I, II e III). Espécies do grupo I (*Acanthamoeba astronyxis*, *A. comandoni* e *A. tubiashi*) são as que apresentam cistos de maiores dimensões (diâmetro médio $>18 \mu\text{m}$) e se caracterizam pela forma estrelada da parede cística interna (endocisto) e a parede externa (ectocisto) é mais ou menos esférica.

No grupo II, estão as espécies de *Acanthamoeba* mais isoladas (*A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. rhyodes*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. triangularis*, *A. divionensis*, *A. mauritaniensis*, *A. lugdunensis* e *A. quina*), seus cistos possuem um tamanho médio com diâmetro $<18 \mu\text{m}$, o endocisto pode apresentar-se de forma estrelada, oval, triangular ou quadrangular e o ectocisto segue mais ou menos o contorno do endocisto (Khan, 2006).

O grupo III compreende as espécies cujos cistos têm diâmetro médio $< 19 \mu\text{m}$ (*A. culbertsoni*, *A. healyi*, *A. jacobsi*, *A. lenticulata*, *A. palestinensis*, *A. pustulosa* e *A. royreba*), o endocisto varia de poligonal a oval e o ectocisto liso (Khan, 2006; Visvesvara *et al.*, 2007). A identificação de espécies de *Acanthamoeba* empregando unicamente critérios morfológicos é muito subjetiva, uma vez que resultados obtidos em estudos taxonômicos apresentam variações importantes quando o uso de isoenzimas e biologia molecular são aplicados.

As características morfológicas dos cistos são influenciadas pelas condições ambientais. Alguns trabalhos relatam que mesmo controlando as condições de cultivo e de encistamento, observa-se que diferentes espécies apresentam características similares em seus cistos e que em cultivos monoclonais aparecem cistos de diversas morfologias (Visvesvara, 1991).

2.2.3.2 Classificação do gênero *Acanthamoeba* spp. com base no sequenciamento do gene SSU rRNA

Os eucariotos contém DNA ribossômico (rDNA) uma estrutura conservada, complexa e distinta. As regiões conservadas permitem construir oligonucleotídeos e através da técnica de PCR amplificar o gene ribossômico de diferentes organismos. A subunidade menor do gene ribossômico (SSU) é frequentemente utilizada nas análises filogenéticas e evolutivas de protozoários

A classificação das espécies de *Acanthamoeba*, baseada na determinação de genótipos foi inicialmente estudada por Gast *et al.*, 1995, que demonstraram a partir do desenvolvimento de sondas de oligonucleotídeos gênero-específicos, diferenças na identidade molecular entre isolados de uma mesma espécie de *Acanthamoeba*.

A organização do gênero sofreu uma revolução quando Stothard *et al.* (1998), a partir da análise da variação das sequências da subunidade menor (SSU) do gene 18S do rRNA de diversos isolados de amebas, dividiram *Acanthamoeba* spp. em diferentes genótipos, que resultou na classificação de 53 isolados de *Acanthamoeba* em água, solo, poeira e amostras clínicas, em 12 tipos de sequências ou genótipos (numerados de T1 a T12), separados por divergência $\geq 5\%$ entre as sequências (divergência $\leq 5\%$ colocam os isolados em um mesmo genótipo). Sequentemente outros pesquisadores classificaram novos isolados em mais genótipos: T13, T14 (Gast, 2001) e T15 (Hewett *et al.*, 2003). Os genótipos T16 e T17 e T18 foram recentemente descritos, ambos isolados de água natural de lagoa doce e de lesões em humano (Corsaro e Venditti, 2010, Nuprosert *et al.*, 2010, Qvarnstrom *et al.*, 2013).

O genótipo T16 foi isolado pela primeira vez em amostras clínicas no presente trabalho (Carlesso *et al.*, 2014). Observou-se, assim, que os grupos gênicos não tinham relação com a classificação por espécie baseados na classificação morfológica, evidenciando que a identificação molecular era mais precisa. E assim a taxonomia molecular descreve 18 genótipos (também

chamados de ribótipos) diferentes dentro do gênero *Acanthamoeba*, sendo eles nomeados T1, T2, T2a até T18.

Os genótipos T2, T3, T4, T6 e T11 têm sido isolados clinicamente como agentes causadores da ceratite amebiana, sendo o genótipo T4 em maior número como agente desta patologia, mesmo quando não se trata do genótipo de maior ocorrência em determinado ambiente (Maghsood *et al.*, 2005; Booton *et al.*, 2005). Os genótipos T2a, T4, T5, T10 e T18 foram isolados de EAG. O número de sequências disponíveis vem aumentando nos últimos anos, e o genótipo T4 é o mais isolado no ambiente e está associado aos casos de ceratite em torno de 90% (Maghsood *et al.*, 2005). A grande prevalência de isolamento no ambiente e a maior associação do genótipo T4 à ceratite amebiana; sugere uma maior virulência ou maior quantidade de espécies desse genótipo na natureza, ou as duas hipóteses.

2.2.3.3 Taxonomia atual do gênero *Acanthamoeba* spp.

A Sociedade Internacional de Protozoologistas apresentou uma nova classificação taxonômica para os protozoários, baseada no uso de ferramentas moleculares (Adl *et al.*, 2005). Os organismos eram agrupados em reinos, filos, classes, subclasses, super-ordens e ordens, foram substituídos por uma nova classificação que agrupa os eucariontes em seis grandes grupos ou super-grupos: Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Plantae, Chromalveolata e Excavata (Figura 3). As AVLs potencialmente patogênicas foram incluídas nos dois super-grupos: Amoebozoa e Excavata, *Acanthamoeba* e *Balamuthia mandrillaris* estão no super-grupo Amoebozoa e na subdivisão Acanthamoebidae; *Sappinea* no super-grupo Amoebozoa, subdivisão Thecamoebidae: Flabellinea; *Naegleria fowleri* no super-grupo Excavata, Heterolobosia: Vahlkampfiidae.

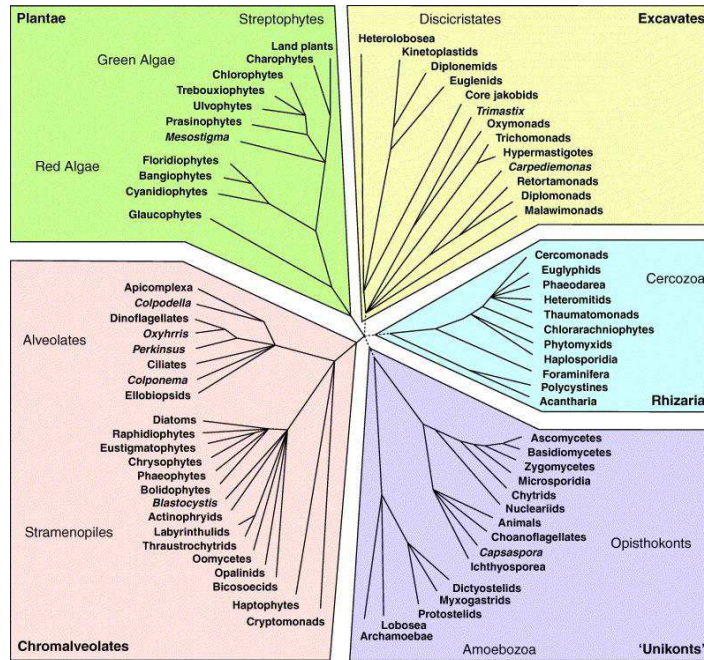


Figura 3. Árvores dos eucariontes proposta pela Sociedade Internacional de Protozoologistas.
Fonte; Keeling, *et al.*, 2005.

2.2.4 Infecções causadas por *Acanthamoeba* spp.

Acanthamoeba podem ser agentes infecciosos de lesões cutâneas, sinusites, osteomelites, doenças pulmonares, ceratites e Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) em humanos e animais. A capacidade de o protozoário produzir, graves infecções, principalmente como oportunista, está associada a um aumento no número de pacientes imunodeprimidos e usuários de lentes de contato (Visvesvara, 2010; Siddiqui e Khan, 2012).

2.2.4.1 Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG)

Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) é uma infecção insidiosa e crônica do Sistema Nervoso Central (SNC). Granulomas formados durante o processo de EAG são compostos de amebas, microglia, macrófagos, célula polimorfonucleares, células T e células B (Khan, 2008). O período de incubação não é bem conhecido, mas, pode variar de semanas, meses a anos. EAG ocorre na maioria das vezes em humanos e animais com fisiologia metabólica ou funções

imunológicas comprometidas e também pode afetar: doentes crônicos, diabéticos, com doenças malignas, com lúpus eritematoso sistêmico, com doença de Hodgkin, transplantados ou pacientes com HIV (vírus da imunodeficiência humana). Os fatores predisponentes incluem: alcoolismo, drogas, tratamentos com esteróides, quimioterapia e radioterapia (Visvesvara, 1991; Turner *et al.*, 2000). *Acanthamoeba* em casos de EAG também foi verificada em crianças e adultos imunocompetentes (Ofori-Kwakye *et al.*, 1986; Singhal *et al.*, 2001).

A porta de entrada de *Acanthamoeba* em indivíduos suscetíveis está na maioria dos casos relacionada com a inalação de amebas através de mucosa nasal e de pulmões ou diretamente através do neuroepitélio olfativo ou ainda através de lesões da pele. A partir do local injuriado o protozoário pode alcançar a via hematogênica e atravessar a barreira hematoencefálica e ter acesso ao SNC em seres humanos e animais provocando EAG (Martinez e Janitschke, 1985; Visvesvara, 2010). *Acanthamoeba* spp. também pode causar EAG em animais, incluindo gorilas, macacos, cães, ovinos, bovinos, cavalos e cangurus, assim como aves, répteis, anfíbios, peixes e até mesmo invertebrados (Visvesvara & Maguire, 2006).

O início da EAG é lento e geralmente apresenta manifestações neurológicas e alterações comportamentais. Outros sintomas incluem dor de cabeça, distúrbios visuais, rigidez da nuca, náuseas, vômitos, febre baixa, letargia e ataxia cerebelar, anormalidade mental, aumento da pressão intracranial, hemiparesia, convulsões e coma (Marciano-Gabral e Gabral, 2003; Petry *et al.*, 2006; Visvesvara *et al.* 2007).

2.2.4.2 Diagnóstico de *Acanthamoeba* spp. na EAG

Na EAG em seres humanos geralmente não são encontrados trofozoítos ou cistos de *Acanthamoeba* no LCR. Os altos níveis de anticorpos específicos para *Acanthamoeba* no soro de pacientes são indicativos de infecção. Os níveis de anticorpos em populações normais pode estar

entre 1:20 a 1:60 (Siddiqui & Khan, 2012). Exames do líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com EAG revelou pleocitose linfocítica com elevação moderada das proteínas e a glicose de normal a diminuída. Trofozoítas ou cistos de *Acanthamoeba* geralmente não são encontrados no LCR. Os altos níveis de anticorpos específicos para *Acanthamoeba* no soro de pacientes são indicativos de infecção por EAG. Os níveis de anticorpos em populações normais pode estar entre 1:20 a 1:60 (Siddiqui & Khan, 2012).

A evidência confirmatória vem da demonstração de *Acanthamoeba* spp. nos tecidos infectados, através de colorações como: Gram, Giemsa e hematoxilina e eosina, essas colorações não diferenciam acantameba de macrófagos e de outras células, mas com base na morfologia nuclear dos trofozoítas de acantamebas se consegue fazer essa diferenciação. A estrutura nuclear de acantameba tem cariossoma pronunciado e envolvido por um halo perinuclear, que é diferente de células inflamatórias. Outras colorações são usadas para identificar cistos nos tecidos como: ácido periódico de Schiff, Gomori metanamina, calcofluor branco.

A utilização de anticorpos específicos para diferentes espécies de *Acanthamoeba* em conjunto com a coloração por imunofluorescência ajuda na identificação da ameoba. No entanto os organismos podem ser identificados como membros do gênero *Acanthamoeba*, mas a discriminação entre espécies é difícil, uma vez que muitas espécies são antigenicamente relacionadas (Martinez e Visvesvara, 1999; Visvesvara 2010). Métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) também podem ajudar no diagnóstico de *Acanthamoeba* (Maclean *et al.*, 2007; Visvesvara *et al.*, 2007).

2.2.4.3. Tratamento de EGA

O diagnóstico precoce da encefalite amebiana seguido do tratamento é essencial para o prognóstico de sucesso. Não existe um único agente eficaz contra todos os genótipos de

Acanthamoeba. O regime de tratamento inclui sulfadiazina, fluconazol, itraconazol, biguanida polihexametileno ou digluconato de clorexidina juntamente com isotianato de propamidina ou hexamidina, se tiver bactérias associadas com a infecção deve ser incluídos antibióticos como: neomicina ou cloranfenicol. As aplicações tópicas para lesões cutâneas causadas por acantameba são: clorexidina, cetoconazol creme, além de pentamidina, sulfadiazina, flucitosina, fluconazol, ou itraconazol que têm resultados terapêuticos de sucesso (Visvesvara *et al.*, 2007).

Os resultados do tratamento de EGA são poucos positivos, em grande parte são por causa de vários fatores como: a falta de sintomas claros, a falta de confiança nos testes de diagnósticos não invasivos e a falta de conhecimento dos analisadores dos exames. O diagnóstico quase sempre é feito *pos-mortem* (Figura 4). Em raros casos EAG e infecções cutâneas já foram tratadas com sucesso (Marciano-gabral & Gabral, 2003; Visvesvara *et al.*, 2007; Walia *et al.*, 2007). O número de mortes associadas à EAG pode ser de 1,57 das 10.000 mortes de HIV/AIDS nos Estados Unidos e este número pode ser subestimado em países subdesenvolvidos (Siddiqui & Khan, 2012).

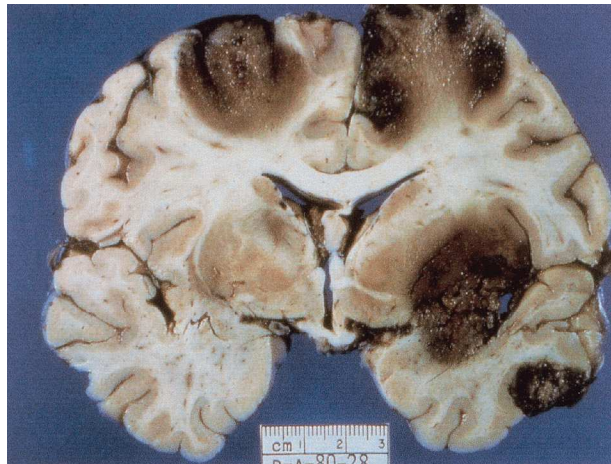


Figura 4. Secção coronal dos hemisférios cerebrais com necrose cortical e necrose subcortical de um caso humano fatal de GAE.

Fonte: Marciano- Gabral e Gabral, 2003.

2.2.4.4. Lesões cutâneas por *Acanthamoeba* spp.

A maioria dos pacientes com HIV na fase da AIDS, principalmente com acantamebíase disseminada, apresentaram infecções na pele como manifestação inicial da doença, as lesões são descritas como: pápulas, pústulas, nódulos e úlceras subcutâneas ou dérmicas, afetam mais as extremidades, tronco e face (Figuras 5 e 6). Alguns autores relataram que pacientes HIV negativos e com acantamebíase disseminada, tiveram as lesões cutâneas como manifestação inicial em até 90% dos casos (Martinez, 1985; Finhin *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2010).

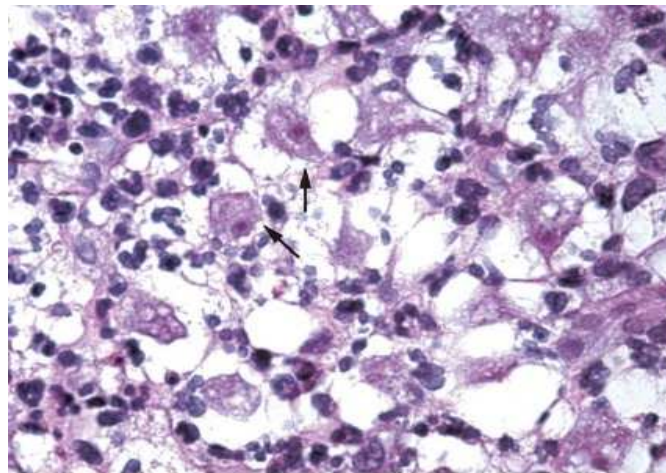


Figura 5. Vários trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. em meio a restos necróticos da biópsia de abscesso da pele. Dois trofozoítos com acantopódios e nucléolo proeminente (setas). Hematoxilina-eosina, ampliação original de 160x. Fonte: Galarza *et al.*, 2009.



Figura 6. Lesões cutâneas ulceronecroticas por *Acanthamoeba* spp. em paciente aidético. Fonte Galarza *et al.*, 2009.

2.2.4.5. Ceratite por *Acanthamoeba* spp.

Acanthamoeba 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 (Martinez, 1985; Simmons *et al*,1998; Siddiqui e Khan, 2012). Ceratite crônica é outra doença em que espécies de *Acanthamoeba* estão implicadas. 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 (Lorenzo-Morales *et al.*, 2010).

Ao contrário da encefalite, a ceratite por *Acanthamoeba* pode ocorrer em indivíduos imunocompetentes. 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 ou micro 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. Após a penetração, seguem-se: ulcerações, infiltrado em forma de anel e inflamações (Figura 7) (Siddiqui & Khan, 2012).



Figura 7. Ceratite por *Acanthamoeba* spp.
Fonte: Siddiqui e Khan, 2012.

Os sintomas mais comuns da ceratite por *Acanthamoeba* são fotofobia, opacidade da córnea, dores intensas (normalmente desproporcional à gravidade aparente das lesões) e diminuição da visão (Visvesvara, 2010). Estes sintomas são muito semelhantes aos da ceratite causada por herpes vírus e fungos e em muitos casos ocorre à identificação incorreta do agente etiológico. O uso de lentes de contato associada à dor local intensa em paciente com infecção ocular é indicativo de ceratite amebiana (Siddiqui & Khan 2012).

2.2.4.6. Diagnóstico e tratamento de ceratite por *Acanthamoeba* spp.

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 (Marciano-Cabral & Cabral, 2003). 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, 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 (Siddiqui & Khan 2012).

Dentre os métodos utilizados em laboratórios clínicos, o cultivo de biópsia da córnea, e microscopia do raspado da córnea corados com hematoxilina-eosina ou outros corantes mais específicos, como o calcofluor branco, que reage especificamente às paredes celulósicas das formas de resistência de *Acanthamoeba* spp., os cistos, são amplamente utilizados (Da Rocha-Azevedo *et al.*, 2009). Para o diagnóstico de ceratite amebiana em usuários de lentes de contato, a análise também pode ser feita através da análise das lentes de contato e de seus estojos (Marciano-Cabral & Cabral 2003). A microscopia confocal *in vivo* surgiu como uma valiosa ferramenta não invasiva

para o diagnóstico de ceratite infecciosa grave (Visvesvara *et al.*, 2007). Metodologias baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) também foram desenvolvidas para a detecção de *Acanthamoeba* já que existem sequências de reconhecimento específicas para este gênero de amebas (Qvarnstrom *et al.*, 2006).

Os tratamentos utilizados para infecções por *Acanthamoeba* são empíricos, baseados no uso de antimicrobianos em numerosas combinações (Lorenzo-Morales *et al.*, 2010; Roberts & Henriquez, 2010). A maioria deles tem ação sobre os trofozoítos, mas pouco efetivos sobre os cistos, o que leva a recidiva das infecções na maioria dos casos (Schuster & Visvesvara, 2004b Dart *et al.*, 2009).

Dentre as drogas atualmente recomendadas para o tratamento de ceratite por *Acanthamoeba* o polihexametileno biguanida (PHMB), clorhexidina, diamidinas, isotionato de 19 propamidina (Brolene) e hexamidina (Desomedine). Ainda podem ser utilizados antifúngicos como miconazol, fluconazol e cetoconazol e em casos de infecção bacteriana associada, pode-se ainda utilizar neomicina ou cloranfenicol.

O tratamento da infecção ocular é difícil e de longo prazo. As drogas de aplicação tópica são utilizadas por dois ou três dias, a cada hora. Posteriormente o número de aplicações por dia é reduzido, porém o tratamento pode durar vários meses, chegando um ano (Lorenzo-Morales *et al.*, 2010; Trabelsi *et al.*, 2012). O tratamento quando realizado na fase tardia, poderá não ter o efeito esperado, fazendo-se necessárias intervenções cirúrgicas como ceratoplastia, debridamento e transplante de córnea (Marciano-Cabral & Cabral, 2003). Quando o tratamento não é realizado, poderá ocorrer ulceração da córnea, com presença de infiltrado no estroma, perfuração e finalmente, perda de visão (Saeed *et al.*, 2009).

2.2.5. Patogênese de *Acanthamoeba* spp.

A instalação da doença provocada por *Acanthamoeba* inicia com a adesão à célula hospedeira com o primeiro passo e é mediada por uma proteína de ligação a manose expressa na superfície de *Acanthamoeba* (Garate, 2004). As adesinas também estão incluídas neste processo de adesão. Entre os receptores da célula hospedeira, receptor Toll-like 4 (TLR4) mostrou envolvimento no reconhecimento de *Acanthamoeba* induzem a secreção de interleucina- β , a interleucina- α , TNF- α , interferon- γ , citocinas em células da córnea humana (Sissons *et al*, 2004). Outros fatores que podem contribuir para a patogênese *Acanthamoeba* incluir ecto-ATPases estes estão envolvidos na ativação da caspase-3 que faz parte da cascata da apoptose celular (Sissons *et al*, 2004). As atividades da neuraminidase de *Acanthamoeba* pode ser relevante na colonização do parasita, e também importante na produção de dano do epitélio corneano rica em ácido siálico e nas alterações de glicolípídeos associados meningoencefalite.

Os fatores independentes de contato, *Acanthamoeba* possui enzimas hidrolíticas, incluindo elastases (Ferrante & Bates, 1990), fosfolipases (Mortazavi *et al*, 2011), glicosidases e uma variedade de serina, cisteína e metaloproteases (Panjwani 2010). No entanto, os seus mecanismos precisos de ação no nível molecular estão apenas começando a emergir. Em geral, o mecanismo pelo qual o *Acanthamoeba* rompe barreiras biológicas é complexo e é susceptível de envolver tanto parasita (adesinas, proteases, fosfolipases), bem como determinantes do hospedeiro [interleucina- β , a interleucina- α , TNF- α , interferon- γ , sediar a apoptose celular. Além acima mencionados fatores de virulência potenciais, a capacidade de *Acanthamoeba* para sobreviver a condições ambientais adversas e sua resistência a fármacos quimioterapêuticos por diferenciação em cistos contribui para a sua patogenicidade .

2.2.6 *Acanthamoeba* spp. em animais

Atualmente são poucos os relatos de infecções por *Acanthamoeba* em cães. Acredita-se que isto pode ser devido ao difícil diagnóstico do protozoário e à falta de profissionais especializadas no assunto. *Acanthamoeba* spp. pode causar infecção no SNC, do tipo Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG), em diversos animais, incluindo gorilas, macacos, ovinos, bovinos, equinos, cangurus, pássaros, répteis, anfíbios e peixes. O organismo também foi isolado a partir de outros órgãos de animais como: pele, tireóide, pâncreas, coração, pulmões, linfonodos e rins (Visvesvara & Maguire, 2006; Visvesvara *et al.*, 2007).

O primeiro caso relatado de *Acanthamoeba* isolada de cão ocorreu no Vietnã do Sul. O animal era da raça Pastor Alemão e apresentava uma lesão no escroto. A infecção causada pela ameba teve manifestações multifocais necrohemorrágicas no coração, pulmões, fígado e pâncreas, onde foram observados numerosos organismos morfológicamente compatíveis com *Acanthamoeba*. Os autores sugerem que a invasão da ameba no cão, possa ter ocorrido através da lesão do escroto e propagou-se pela via hematogênica, ou através do trato respiratório por inalação de organismos ou por extensão direta de uma infecção inaparente nasal (Ayres e Garner em 1972). A partir daí vários outros relatos ocorreram (Kadlec, 1978; Pearce *et al.*, 1985; Visvesvara, 1991; Buergelt *et al.*, 1991; Bauer *et al.*, 1993; Greene & Howerth, 2006).

Estudos baseados no sequenciamento de isolados de *Acanthamoeba* de peixes, répteis e de ceratite humana pertencentes ao grupo T4, sugerem que características que facilitam esta ameba a infectar animais pode também ajudar infectar humanos (Visvesvara *et al.*, 2007).

Os veterinários estão cada vez mais buscando conhecimento sobre a epidemiologia, ecologia e possíveis vetores ou hospedeiros de *Acanthamoeba*, possibilitando a prevenção e um tratamento adequado para as infecções provocadas por estes protozoários.

2.2.7. Citopatogenicidade *in vitro* de *Acanthamoeba* spp.

Os vários relatos na literatura especializada descrevem os testes de citopatogenicidade como os mais indicados, para avaliar a virulência de *Acanthamoeba* spp. principalmente com células epiteliais de mamíferos. Existe certa discordância entre alguns relatos sobre os testes mais indicados principalmente, quanto ao uso de animais de laboratório para averiguar a patogenicidade de *Acanthamoeba*. Segundo alguns autores a dificuldade de padronizar para amebas: a via de inalação, a quantidade do inóculo de trofozoítas, a virulência da cepa e a resposta da suscetibilidade individual dos animais, faz com que essa técnica seja abandonada cada vez mais (De Jonckheeret, 1980; González-Robles *et al.*, 2013). Os comitês de ética em geral, também sugerem o uso dos testes de citopatogenicidade *in vitro*, *ex vivo* no lugar de *in vivo*.

Cursons e Brown (1978) compararam o tempo e a concentração do inóculo de *Acanthamoeba* spp. e *Naegleria* spp., necessários para o desenvolvimento do efeito citopático em cultura de células VERO, com que eram necessários para causar a morte de ratos. Os autores concluíram que o tempo que as amebas levam para produzir o efeito citopático nas células VERO é duas vezes mais rápido em comparação com a inoculação em ratos. Nesse estudo foi observado um aumento da virulência de *Acanthamoeba* e *Naegleria* pela passagem na cultura de células VERO quando comparada à inoculação de cultivo axênico em ratos.

Os autores do estudo relatado acima, sugerem que o uso de culturas celulares tem vantagens em relação ao uso de animais para avaliar a patogenicidade de amebas, como: evitar as variações da suscetibilidade individual dos animais de laboratório, além da dificuldade de decidir quantos trofozoítas são necessários para causar a infecção.

2.2.8. Interação de *Acanthamoeba* spp. com macrófagos.

Acanthamoeba spp. e macrófagos compartilham notáveis semelhanças em suas estruturas celulares (características morfológicas e ultra-estruturais – figura 8), na motilidade molecular, na fisiologia e na bioquímica. Alguns autores acreditam que macrófagos e amebas evoluíram igualmente nos seus processos evolutivos (Cosson & Soldati, 2008; Khan, 2009). Na análise do genoma parcial de *Acanthamoeba*, observou-se que a ameba pode organizar-se internamente como uma célula humana (Anderson *et al.*, 2005). A habilidade da ameba de distinguir entre eu (o que é dela) e não-eu (células estranhas); significa a raiz fundamental do sistema imune de várias espécies do reino animal (Janeway *et al.*, 2001). Trabalhos recentes mostram que *Acanthamoeba* é considerada “cavalo de Tróia” de vários microrganismos (vírus, bactérias e leveduras), não se sabe a real especificidade para a captação pela ameba dessa diversidade de organismos (Khan, 2009). Reciprocamente macrófagos são considerados “grandes devoradores”, sendo a maior linha de defesa contra microrganismos invasores. A principal propriedade dos macrófagos é a fagocitose, da mesma forma que ocorre com *Acanthamoeba* (Siddiqui & Khan, 2012).

O processo de fagocitose na ameba e nos macrófagos, é dependente de actina resultando na formação de pseudópodes e motilidade celular. *Acanthamoeba* tem sido utilizada como modelo para estudar o citoesqueleto, a estrutura, a função e as proteínas de ligação de actina e miosina (Khan, 2009). Portanto há muita semelhança, entre amebas e macrófagos, em nível molecular, na estrutura, função e regulação bioquímica de fagocitose e motilidade celular. Porém, algumas diferenças existem entre os dois, por exemplo: a capacidade de *Acanthamoeba* viver livremente no ambiente e como parasita e se diferenciar em um estágio de cisto em condições adversas, são características não observadas em macrófagos. (Cohn & Benson, 1964; Cohnetal, 1965).

A evolução da fagocitose provavelmente apareceu mais cedo em eucariontes unicelulares (Delves *et al.*, 2006). Existe uma semelhança entre várias bactérias para infectar e se

multiplicar no interior de macrófagos humanos e amebas, as formas são análogas e utilizam os mesmos mecanismos para a transcrição, pós-transcrição e níveis celulares. Em suma, bactérias poderiam realizar de maneira semelhante à infecção tanto em macrófagos como em amebas, uma vez que amebas e macrófagos humanos têm propriedades comparáveis (Yan *et al.*, 2004; Segal & Shuman, 1999; Al-Khodor *et al.*, 2009). Ainda: *Acanthamoeba* poderia ser utilizada como um campo de treinamento para microrganismos tornarem-se patógenos, “aprendendo” a evitar a morte mediada por macrófagos em humanos e animais.

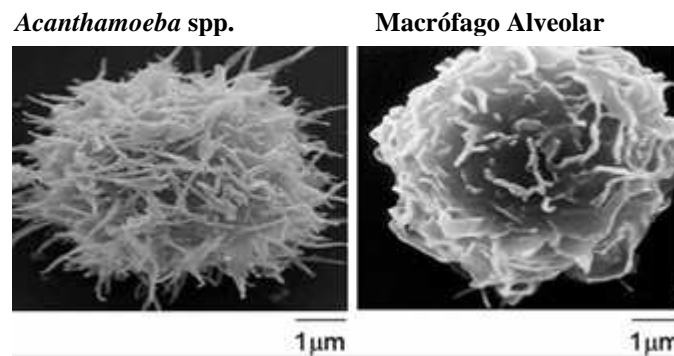


Figura 8. Microscopia de transmissão: *Acanthamoeba castellanii* do grupo T4 e um macrófago alveolar.
Fonte: Khan, 2008.

2.2.9. Microrganismos Resistentes a *Acanthamoeba* spp. (MRA)

Acanthamoeba pode hospedar diversos microrganismos incluindo: algas, bactérias, fungos, protozoários e vírus, alguns são potencialmente patogênicos para humanos e animais. A natureza precisa dessa simbiose não está bem clara, mas sugere-se que essas interações com acantameba e outras AVL permitam que microrganismos patogênicos sobrevivam a condições hostis e que possam ser transmitidos para hospedeiros suscetíveis. Desta forma, *Acanthamoeba* no meio ambiente, pode funcionar como reservatório de microrganismos. Pesquisa relacionada a interações

entre *Acanthamoeba* e microrganismos tem aumentado nas últimas décadas, proporcionalmente ao interesse da comunidade médica e científica (Khan & Siddiqui, 2012).

Estudo sobre simbioses de AVL foi publicado pela primeira vez em 1956 por Drozanski, que descreveu a presença de bactérias intracelulares em amebas lisadas. Ciobanu MP (1975), demonstrou microrganismos internalizados em *Acanthamoeba* e evidências sorológicas desses microrganismos em humanos. A partir de então, surgiram numerosos estudos de microrganismos internalizados em AVL, sendo *Acanthamoeba* o protozoário mais encontrado nessas interações. A disponibilidade de ferramentas moleculares, contribuíram para compreensão dessas interações (Greubt & Raoult, 2004).

O interesse nas interações de amebas e microrganismos chamou mais a atenção, quando uma doença misteriosa foi fatal para 29 pessoas de 182 infectadas, durante a 58^a convenção estadual da Legião Americana em julho de 1976. A doença na época ficou conhecida como doença do Legionário, e apenas em 1978 foi atribuída a *Legionella pneumophila*, (Fraser *et al*, 1977; McDade *et al*, 1977; Winn, 1988) Atualmente estima-se que 8.000 a 18.000 pessoas são hospitalizadas com a doença do Legionário por ano nos EUA, no entanto, apenas cerca de 3.000 casos são relatados ao CDC, (MMWR-CDC, 2011).

Tobin e colaboradores (1980), isolaram *L. pneumophila* do ambiente pela primeira vez na água de chuveiro, em unidade de transplantados, de hospital no Reino Unido, no qual dois pacientes após banho, foram contaminados e desenvolveram a doença do Legionário. Faltava descobrir como a bactéria que era fastidiosa nos meios de cultivo, sobrevivia e se multiplicava em ambientes com poucos nutrientes como a água. Rowbotham em 1980 descobriu que *Acanthamoeba* era responsável pela transmissão de *Legionella* para o ser humano, através da inalação de amebas infectadas ou das suas vesículas que ao serem destruídas no trato respiratório inferior libertavam as bactérias que infectavam os macrófagos alveolares (Rowbotham, 1980).

Uma vez que *Acanthamoeba* habita naturalmente ambientes aquáticos e sistemas de armazenamento e distribuição de água de hospitais e órgãos públicos (Carlesso *et al*, 2010, Winck *et al*, 2011) e também é resistente a extremos de temperatura, cloro, pH e osmolaridade quando encistadas, a sua importância como reservatório, como meio de transmissão e multiplicação de *Legionella* parece evidente. Isso pode explicar a emergência da legionelose após a exposição de humanos a aerossóis produzidos por equipamentos como sistemas de ar condicionado, jacuzzis, chuveiros, etc (Harb & Kwaik, 2000).

Entre os MRA, alguns são hóspedes naturais de amebas de vida livre (identificados dentro AVL isolada por enriquecimento), alguns foram recuperados por co-cultura com amebas e alguns foram identificados como microrganismos resistentes a amebas *in vitro*. Alguns são bactérias intracelulares obrigatórias, enquanto outros são bactérias intracelulares facultativas ou bactérias extracelulares. Alguns são estabelecidos patógenos humanos, enquanto outros são patógenos emergentes. A lista não inclui *Enterobacteriaceae* que resistiram à destruição pela AVL somente sob condições não fisiológicas, tais como a cloração. São exemplos de microrganismos facultativos em *Acanthamoeba*: (*Helicobacter pylori*, *Flavobacterium* spp, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium avium*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. simiae*, *M. phlei*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *Afipia felis*, *A. broomae*, *Bosea* spp. *Bradyrhizobium japonicum*, *Caedibacter acanthamoebae*, *Paracaedibacter symbiosus*, *Paracaedibacter acanthamoebae*, *Procabacter acanthamoeba*, *Francisella tularensis*, *Legionella pneumophila* Many species, *L. anisa*, *L. fallonii*, *L. rowbothamii*, outras LLAP, *Listeria monocytogenes*, *Odyssella thelassionensis*. Os MRA obrigatórios estabelecidos incluem: *Chlamydophila pneumoniae*, *Parachlamydia acanthamoebae*, *Simkania negevensis*, *Amoebophilus asiaticus*, *Mycobacterium leprae*, *Ehrlichia*-like organismo *Saccamoebac*, *Rickettsia*-like, *Coxiella burnetii*. Os MRA extracelulares como exemplos tem-se: *Mezorhizobium amorphae*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Ralstonia pickettii*,

Escherichia coli O157, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Molibuncus curtisii* (Greub e Raoult, 2004).

Além de bactérias, já foram obtidos outros grupos de microrganismos em co-cultivo com *Acanthamoeba*, como fungos (*Cryptococcus neoformans*- Greub & Raoult, 2004) e protozoários (*Cryptosporidium* – Gómez-Couso *et al.*, 2007). *Acanthamoeba* também pode albergar alguns vírus como: mimivírus relacionado com os Iridovírus, Poxvírus e Asfarvírus, entre outros, que infectam naturalmente amebas. Juntamente com outros vírus recentemente descobertos, está incluído na família Mimiviridae que contêm os maiores vírus conhecidos (La Scola *et al.*, 2003).

O termo “endossimbiontes”, definido por Buchner (1953), “como uma coabitação regulamentada, harmônica de dois parceiros não aparentados em que um deles vive no corpo do outro”, refere-se à localização dos microrganismos intra-amebas e a estreita relação com estas. Os patógenos de amebas como: amebianos patogênicos, tipo *Legionella* (LLAP – Legionella-like amoebal pathogens), foram denominados de acordo com a sua citopatogenicidade e representam o paradigma das bactérias lisarem as amebas, enquanto outras são consideradas endossimbiontes (*Parachlamydia acanthamoeba*), na qual a relação com o hospedeiro é estável.

Sabe-se que as amebas alimentam-se de microrganismos, utilizando-os como fonte de energia, então o termo “Microrganismos Resistentes às Amebas” (MRA) ou endobiontes, utilizado originalmente por Greub G & Raoult D em 2004, é bastante adequado para o grupo de organismos que não são destruídos pelas amebas. Há indicações que *Acanthamoeba* protege microrganismos de antibióticos (Barker *et al.*, 1995; Miltner *et al.*, 2000) e de substâncias biocidas (Barker *et al.*, 1992), principalmente quando encistadas (King *et al.*, 1988; Steinert *et al.* 1998). Sendo os cistos resistentes a estas e outras agressões ambientais tais como estresse osmótico, salinidade e pH (Rodriguez-Zaragoza, 1994), as amebas têm uma função natural como reservatórios de MRA, permitindo a sua persistência e distribuição no ambiente (Barker & Brown, 1994).

A bactéria *L. pneumophila* é Gram-negativa, intracelular facultativa e responsável por diversas infecções respiratórias que podem culminar em pneumonia, e que podem ocorrer em surtos ou casos isolados, sendo a sua presença associada a fontes de água contaminadas em ambientes públicos, particularmente em ambientes nosocomiais (Stout *et al.*, 1985; Patrizia *et al.*, 2013). A infecção aguda mais grave é conhecida por doença do Legionário enquanto a versão menos grave é a Febre de Pontiac, que tem sintomas análogos aos gripais (Fields *et al.*, 2002). Entre os MRA, os mais estudados pertencem ao gênero *Legionella*, com mais de 50 espécies e classificadas em 70 sorogrupos (Euzeby 2008), sendo a espécie *L. pneumophila* responsável por 80-90% da doença do Legionário, óbitos são variáveis de 1-80% dos casos dependendo do estado imunológico do paciente, (Benin *et al* 2002; Yu *et al*, 2002; Patrizia *et al.*, 2013). Segundo Patrizia e colaboradores (2013), 92% dos casos da doença do Legionário pertencem a *L. pneumophila* sorogrupo tipo LP-1 e *L. pneumophila* Philadelphia-1, os autores sugerem que pode ser devido à grande habilidade da bactéria entrar em células do hospedeiro, da multiplicação e da indução à citopatogenicidade, quando comparado com outros sorogrupos (Patrizia *et al.*, 2013).

Estudos realizados na análise das semelhanças entre as infecções por *Legionella*, principalmente em *Acanthamoeba* e macrófagos, mostram que tanto nas amebas como nos fagócitos humanos, as bactérias se multiplicam em um fagossoma especializado que não se funde com lisossomas (Bozue & Johnson, 1996) e que se apresenta rodeado pelo retículo endoplasmático rugoso (Sinai & Joiner, 1997; Gao *et al.*, 1997). Foi demonstrado também que a proteína de membrana Mip (macrophage infectivity potentiator) potencia a infecção intracelular tanto nos protozoários como nos macrófagos e que *L. pneumophila* utiliza os mesmos genes para poder crescer intracelularmente em macrófagos humanos e em amebas.

De fato, há dados consistentes que indicam que a entrada em monócitos e a virulência de *L. pneumophila* aumentam significativamente após crescimento intracelular em amebas (Fields *et al.*,

1990; Cianciotto e Fields 1992; Cirillo *et al.*, 1994; Cirillo *et al.*, 1997; Cirillo *et al.*, 1999; Segal & Shuman, 1999; Paterson *et al.*, 2011). Essa bactéria tem sido utilizada como um modelo para o estudo de interações com *Acanthamoeba*, o interesse na ameba é devido à semelhança com os macrófagos de mamíferos, principalmente nas atividades fagocitárias e nos receptores de membrana (Yan *et al.*, 2004). Além de *L. pneumophila*, foram descritas outras espécies do mesmo gênero associadas à Febre de Pontiac e pneumonias, tais como *L. anisa*, *L. micdadei*, *L. jordanis* e *L. lytica* entre outras (Fields *et al.*, 1990; Gobbo *et al.*, 1986; Marrie *et al.*, 2001; La Scola *et al.*, 2003).

Além destas espécies de *Legionella* também foram isolados os micro-organismos denominados como Amebianos Patogênicos tipo *Legionella* (LLAP – Legionella-like amoebal pathogens). Embora não cresçam *in vitro* em meio BCYE (buffered charcoal yeast extract), próprio para *Legionella* e não fluoresçam com marcadores específicos para o gênero, estes LLAPs podem ser isolados a partir de amostras de expectoração e ambientais recorrendo-se ao co-cultivo com *Acanthamoeba* spp. (culturas de amebas inoculadas com as amostras contaminadas), em que as amebas se alimentam das bactérias, mas as bactérias resistem à destruição e se multiplicam no interior de *Acanthamoeba*, (Rowbotham 1986; Michel *et al.*, 1998; Adeleke *et al.*, 2001).

Os LLAPs têm sido isolados de doentes com pneumonia, havendo cada vez mais indicações que estas espécies emergentes são responsáveis por casos de pneumonia de etiologia previamente desconhecida, (Fry *et al.*, 1991; McNally *et al.*, 2000). O recurso de métodos moleculares para caracterizar a filogenia destes LLAPs permitiu classificar a maioria como pertencentes ao gênero *Legionella*, e para estas e outras espécies de microrganismos potencialmente patogênicos ao co-cultivo com *Acanthamoeba* sendo o único método viável para conseguir a sua multiplicação e isolamento em laboratório (Greub & Raoult, 2004).

Recentemente foi publicado um estudo em que se cultivaram várias espécies de *Acanthamoeba*, obtidas de sedimento marinho e estuarino. Os ensaios com a técnica de PCR

demonstraram que 48% das culturas de amebas isoladas eram positivas para a presença de *Legionella*, tendo a espécie *L. pneumophila* sido detectada em 4% das culturas. Estes resultados indicam que as amebas capazes de crescer em ambiente marinho podem albergar no seu interior várias espécies de *Legionella* potencialmente patogênicas e protegê-las do estresse salino, (Gast *et al.*, 2011).

A capacidade de alguns microrganismos de sobreviver e se multiplicar dentro de amebas não significa apenas que estas possam servir de reservatório para esses microrganismos. O crescimento intra-amebiano de bactérias pode induzir fenótipos consideravelmente diferentes das espécies mantidas *in vitro*. Essas diferenças podem ocorrer a nível celular e fisiológico, por exemplo, expressão de lipopolissacáridos, ácidos graxos e proteínas de superfície (Barker *et al.*, 1993) ou ainda na sua capacidade de sobrevivência e patogenicidade (Barker e Brown, 1994). No decorrer da evolução da relação predador-presa com protozoários, as bactérias desenvolveram mecanismos de defesa, como a secreção de toxinas, a capacidade de evitar a fusão fagossoma-lisossoma (Hilbi *et al.*, 2007) e a resistência ao pH ácido do lisossoma (Maurin *et al.*, 1992).

Por outro lado, alguns autores referem que a própria patogenicidade de *Acanthamoeba* pode ser aumentada após infecção por MRAs (Fritsche *et al.*, 1998). Protozoários com microrganismos internalizados podem ter co-evoluído e com isso alguns organismos se tornaram endossimbiontes obrigatórios ou facultativos, que infectam e lisam seus hospedeiros proporcionando a algumas espécies a capacidade de fazer o mesmo dentro de macrófagos de animais ou outras células hospedeiras (Brown & Barker, 1999; Weissenberger *et al.*, 2007).

Os dados obtidos até agora sugerem que as amebas têm um papel ambiental importante na manutenção, evolução e transmissão de microrganismos patogênicos para o ser humano (Goebel & Gross, 2001; Brown & Barker, 1999), tendo sido apropriadamente chamadas “cavalos de Tróia” do mundo microbiano (Brown & Barker, 1994) e identificadas como vetores desses microrganismos

por vários autores (Winiiecka-Krusnell & Linder, 1999; Greub & Raoult, 2002, Greub & Raoult 2004). A resistência de microrganismos à destruição por células predadoras também tem interesse em termos evolutivos, porque poderá contribuir para a compreensão dos mecanismos que terão levado à origem de organelas na célula eucariota (Corsaro *et al.*, 1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da presente tese estão organizados em três capítulos apresentados na forma de artigos científicos.

No capítulo I é apresentado o artigo intitulado “Characterization of Isolates of *Acanthamoeba* from the Nasal Mucosa and Cutaneous Lesions of Dogs” publicado na revista *Curr Microbiol*. Este artigo descreve o isolamento e a caracterização genotípica, termo e osmotolerância e patogenicidade em células VERO de isolados de *Acanthamoeba* de amostras clínicas, obtidas de cães com problemas de pele no hospital de clínicas veterinária – UFRGS- Porto Alegre – RS e representa o primeiro trabalho de isolados de *Acanthamoeba* de amostras clínicas de animais do grupo de pesquisa de AVL da UFRGS. No presente artigo é relatado o primeiro isolamento do genótipo T16 em amostra clínica, pág 33.

No capítulo II é apresentado o artigo intitulado “Bacterial Endosymbionts in *Acanthamoeba* Isolates from the Nasal Mucosa and Cutaneous Lesions of Dogs” submetido para publicação na revista *Applied Environmental Microbiology*. Este artigo descreve o primeiro estudo de endossimbiontes internalizados em *Acanthamoeba* isolada de amostras clínicas de animais na América Latina, pág 39.

O capítulo III apresenta o manuscrito em preparação, que tem como título “Investigation of the interaction of *Acanthamoeba* with Murine Macrophages J774.A1”. Neste trabalho foi verificada a adesão e comportamento entre os isolados de *Acanthamoeba* de amostras clínicas de cães e macrófagos, pág 59.

CAPÍTULO I

Curr Microbiol
DOI 10.1007/s00284-014-0532-9

Characterization of Isolates of *Acanthamoeba* from the Nasal Mucosa and Cutaneous Lesions of Dogs

A. M. Carlesso · M. B. Mentz · M. L. S. da Machado ·
A. Carvalho · T. E. T. Nunes · V. J. Maschio ·
M. B. Rott

Received: 26 September 2013 / Accepted: 17 December 2013
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract *Acanthamoeba* spp. are free-living amoebae that are ubiquitously distributed in the environment and can cause encephalomyelitis in animals and humans. The factors that contribute to *Acanthamoeba* infections include parasite biology, genetic diversity, environmental spread, and host susceptibility. The aim of the present study was to characterize isolates of *Acanthamoeba* from the nasal mucosa and cutaneous lesions of dogs in order to access the occurrence and pathogenicity of these organisms in this animal group. We studied 13 isolates of *Acanthamoeba* confirmed by polymerase chain reaction. They were sequenced, the genotype was determined, and their potential of pathogenicity was evaluated.

Introduction

Free-living amoebae (FLA) belonging to the genus *Acanthamoeba* are ubiquitous, and have been isolated from dust, soil, swimming pools, fresh and salt water, drinking water, contact lens washing solutions, ventilation systems, dialysis apparatus, hydrotherapy areas in hospitals, dental irrigation systems, bottled mineral water, distilled water bottles, insects, vegetables, and surgical instruments [5, 7, 20, 21, 26, 39]. This wide dispersal of the organism facilitates contact with humans and animals. Since these amoebae have the ability to exist as free-living organisms in nature and

only occasionally invade a host and live as parasites within host tissue, they have also been called amphizoic amoebae [27]. In humans, *Acanthamoeba* have been cultured from the cornea and corneal biopsies, nasal and sinus cavities, ears, throat, pharyngeal swabs, lung tissues, skin lesions, and human feces [33, 34]. *Acanthamoeba* may have veterinary significance, as demonstrated by the presence of amoebae in diseased or dead cows, dogs, pigs, rabbits, pigeons, sheep, reptiles, fish, turkeys, keel-billed toucan (*Ramphastos sulfuratus*), horses, and non-human primates [19, 37]. Infections with *Acanthamoeba* spp. were reported in the central nervous system (CNS) in dogs [1, 2, 4, 10, 28].

Based on the above, it is generally accepted that *Acanthamoeba* is ubiquitously present in the environment and that humans routinely and commonly encounter this organism, as evidenced by the presence of anti-*Acanthamoeba* antibodies in healthy populations.

The FLA *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, and *Balamuthia mandrillaris* can cause encephalomyelitis in animals and humans [19, 23, 38]. Strains of *Acanthamoeba* cause three clinical syndromes: granulomatous amoebic encephalitis (GAE), an infection that produces severe clinical disease, which is challenging to diagnose *ante mortem*, extremely difficult to treat, and usually fatal; disseminated amoebic disease (e.g., skin, sinus, and pulmonary infections), which has occurred in AIDS patients; and amoebic keratitis (AK), a painful, vision-threatening infection caused by these amoebae. AK is associated with trauma or contact lens wear and the use of amoeba-contaminated saline. Individuals who develop GAE or disseminated disease are usually immunocompromised, whereas those with amoebic keratitis are generally immunocompetent [16, 33]. The taxonomy and classification of these protozoa are under revision, following the successful application of molecular techniques [3, 35]. Evolutionary

A. M. Carlesso (✉) · M. B. Mentz · M. L. S. da Machado ·
A. Carvalho · T. E. T. Nunes · V. J. Maschio · M. B. Rott
Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
e-mail: anacarlesso@yahoo.com.br

M. B. Rott
e-mail: marilise.rott@ufrgs.br

studies have led to the identification of at least 18 genotypes (T1–T18) based on 18S rRNA gene sequencing [3, 8, 11, 22, 29, 35]. The aim of the present study was to investigate and isolate *Acanthamoeba* from the nasal cavity and skin lesions of dogs in the city of Porto Alegre, Southern Brazil, in order to assess the occurrence of this organism in this animal group.

Materials and Methods

Ethics Statement

Experiments with dogs were performed in compliance with the guidelines of the Institutional Animal Care and Committee on Ethics of Animal Experimentation (“Comissão de Ética em Experimentação Animal”, national guidelines, Law number 11.794, 8/10/2008) from Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre- RS (approved protocol number 18631).

Clinical Samples

This study was designed in Porto Alegre, the capital of Rio Grande do Sul State, Brazil, in dogs of both sex, unknown ages attended at the Dermatology Department of the Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Clinical samples were collected from nasal and skin lesion from dogs using sterile swabs for amoebae isolation. Swabs were gently rubbed against the nasal mucosa or skin lesion and transferred into sterile tubes.

Amoebae Culture

The swabs were placed in centrifuge tubes of 50 mL with sterile distilled water for 2 h. Later, the material was centrifuged and the supernatant discarded. The pellet was resuspended in 500 μ L of Page saline. The isolation of amoebae was made in monoxenic cultures inoculating 100 μ L of the sediment in Petri dishes containing non-nutrient agar 1.5 % with overlayer of *Escherichia coli* (ATCC 25922) suspension that had been heat inactivated (2 h at 56 °C). The plates were sealed with Parafilm® (SPI Supplies, West Chester, PA) and then incubated at 30 °C for up to 30 days [9]. Each plate was examined daily under a light microscope (at 100 \times) to check the presence of FLA. All positive samples were cloned by the method of dilution, where only one microorganism is seeded in each isolate. The isolates were cultured axenically in 75-cm² culture tissue flask without shaking, at 30 °C, in PYG medium [0.75 % (wt/vol) proteose peptone, 0.75 % (wt/vol) yeast extract, and 1.5 % glucose] supplemented

with penicillin G potassium (400 IU/mL) and streptomycin (400 mL/mL) [32].

Molecular Identification of *Acanthamoeba* Isolates

The total DNA in sample of each FLA-positive culture (containing 10⁶ trophozoites) was extracted, as described by Salah and Iciar [30]. Primers JDP1 (5'-GGCCCAGATCGT TTACCGTGAA-3') and JDP2 (5'-TCTCACAAGCTGCTA GGGAGTCA-3') were used to amplify a 423- to 551-bp fragment for the 18S rDNA, termed ASA.S1 region of the gene (*Rns*) coding for the amoeba's nuclear small-subunit ribosomal RNA [31]. The polymerase chain reaction (PCR) was performed as described by Booton et al. [3]. In brief, the amplifications were carried out in a 25 μ L volume containing 20–30 ng of DNA, 0.2 mM dNTPs (Mix, Invitrogen TM), 0.4 μ M of each oligonucleotide, reaction buffer (50 mM KCl₂, 10 mM Tris-HCl), 1.5 mM MgCl₂, and 1 U of Platinum® Taq DNA Polymerase (InvitrogenTM). The amplification reaction was carried out in a PTC-150 Minicycler MJ Research thermocycler, under the following conditions: 94 °C for 1 min, 67 °C for 1 min, 72 °C for 1 min, and 72 °C for 5 min. The amplification product was separated in 1.5 % agarose gel, stained with 0.5 M/mL ethidium bromide, and observed under UV-light transilluminator. PCR products were purified using a QIAquick® extraction kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The genomic fragments were sent to Ludwig Biotec Ltda (Brazil) and resolved with a MegaBace 1000 automated sequencer. In order to classify the *Acanthamoeba* isolates of this study, all sequences of 18S rDNA gene were uploaded into the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program of the US National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), these sequences were deposited in the GenBank database and 7 of these are already available under the accession numbers: KF054072, KF054073, KF054074, KF054075, KF054076, KF054077, KF962051, KF962049, KF962050, KF962052, KF962048, KF962047 and KF054078.

Tolerance Assays

All the tolerance assays were carried out in triplicate, with the environmental (Neff—ATCC 30010) and clinical (T4—ATCC 50492) strains of *A. castellanii* used as reference examples of isolates.

Osmotolerance

In order to investigate the effect of osmolarity on the growth of *Acanthamoeba*, 10³ trophozoites of each isolate were transferred to the center of fresh plates of 1.5 % non-

nutrient agar containing no mannitol (as a control) or 0.5 or 1.0 M mannitol each, with the usual overlayer of *E. coli* suspension. The plates were incubated at 30 °C for 10 days, and the growth was evaluated. For this, the number of trophozoites or cysts seen, about 20 mm from the center of each plate, was counted in five microscope fields at 100×, and the presence of growth and no growth being scored as – and +, respectively, according Caumo et al. [6].

Thermotolerance

For the assay of tolerance to temperature, plates were inoculated as for the osmotolerance assay and incubated at 30 °C (as a control), 37, or 42 °C for 10 days. Growth at the end of this incubation time was assessed in the same way as for the osmotolerance assays.

Cytopathic Effect of *Acanthamoeba* on VERO Cells

The cytopathic effect (CPE) of *Acanthamoeba* isolates on VERO cells line (African Green Monkey Kidney, ATCC CCL-81) was evaluated three times by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay according Mosmann [25]. In brief the VERO cell line was cultured and maintained in complete Dulbecco's modified Eagle medium (i.e., DMEM supplemented with 10 % fetal bovine serum [GIBCO], 100 U/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin) at 37 °C with 5 % CO₂. Cells were seeded at a concentration of 4.0×10^4 cells per well on 96-well microplates and incubated for 24 h to form confluent monolayers. Then, the medium was removed and fresh DMEM with *Acanthamoeba* isolates 4×10^4 (D1, D3, D4, D5, D7, D8, D11, D12, D13, and D16) were added to each wells in triplicate and incubated at 37 °C for 24 h. After this time, 20 µL of MTT (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA) solution (3 mg/mL) was added to each well and incubated for a further 4 h. The supernatant was removed with untransformed MTT and 100 µL of DMSO (Dimethyl sulfoxide) was added to each well for solubilizing formazan crystals, then, the optical density (OD) was measured in a Microplate reader (Benchmark BioRad) at 570 nm with a 620 nm reference filter. The amount of formazan produced was directly proportional to the number of living cells in culture. Results were expressed as the percentual OD of viable cells treated with *Acanthamoeba* isolates in comparison to the OD of untreated control cells.

$$\% \text{ cell viability} = \frac{xOD \text{ sample} - xOD \text{ blank}}{xOD \text{ control} - xOD \text{ blank}} \times 100$$

xOD sample = mean of optical density of the wells with each isolate (sample)

xOD control = mean optical density of the wells with untreated cells

xOD control = mean optical density of the wells with DMSO only (blank)

Statistical Analysis

Statistical comparisons between two groups were performed by the Tukey-test. For multiple comparisons among groups, one-way ANOVA was used, and then a post hoc least significant difference test was performed.

Results and Discussion

Thirteen isolates of *Acanthamoeba* were analyzed: six from nasal mucosa and seven from skin lesion. They were sequenced and the genotype determined as T3 (1 sample), T4 (2 samples), T5 (2 samples), and T16 (1 sample) from nasal mucosa. T3 (1 sample), T4 (3 samples), and T5 (3 samples) from skin lesion (Table 1). Kadlec [15] examining samples from domestic animals, found 15 species and strains of FLA in their bodies. One of these, *Hartmannella vermiformis*, was isolated from the bronchi of one dog; and several isolates of *Acanthamoeba* from the prepuce of a bull, vagina of a cow, and liver of a rabbit. McConnell et al. [24] described a case of *Hartmannella (Acanthamoeba)* infection in a bull. The disease was manifested by multifocal necrohemorrhagic nodules throughout the lung. The suggested mode of entry of the organism was via inhalation of the organisms or by direct extension from an inapparent nasal infection. Bauer et al. [2] isolated *Acanthamoeba* from lung lesions of a greyhound puppy that was affected by a progressive fatal neurologic and respiratory disease. Ayers et al. [1] reported *Acanthamoeba* as a causative agent of infection in a dog that showed multifocal necrohemorrhagic lesions in the heart, lungs, liver, and pancreas. The infection may have been caused by local invasion of a wound and hematogenous spread, via the respiratory tract, by inhalation of the organisms, or by direct extension of an inapparent nasal infection. Many dogs with signs of CNS do not receive a *post-mortem* examination, and the cause of death or disease is not established. Hodge et al. [13] and Ithoi et al. [14] isolated *Acanthamoeba* in cornea swab samples from cats with eye symptoms. In our study, we evaluated *Acanthamoeba* isolates from nasal mucosa and from skin lesions from live dogs, in order to assess the presence of this organism at these sites, which could be used as a gateway. The thirteen isolates found were tested for osmotolerance and thermotolerance (Table 2). These, five isolates grew in the presence of 1 M mannitol; thirteen isolates grew at 37 and

Table 1 Genotypic characterization of isolates found in dogs in RS-Brazil

Isolates	GenBank accession	Genotype	Reference sequences GenBank accession	Identity ^a (%)
D1	KF054072	T16	GQ342607.1	93
D2	KF054073	T4	JF702896.1	99
D3	KF054074	T4	JX104341.1	97
D4	KF054075	T5	AB741044.2	98
D5	KF962051	T3	HQ236519.1	98
D7	KF054076	T4	JX043490.1	93
D8	KF962049	T5	AB741044.2	98
D11	KF054078	T3	S81337.1	99
D12	KF962050	T5	AB741044.2	96
D13	KF962052	T5	AB741044.2	96
D15	KF962048	T3	KC694191.1	99
D16	KF054077	T4	HM036176.1	98
D18	KF962047	T4	AF019052.1	98

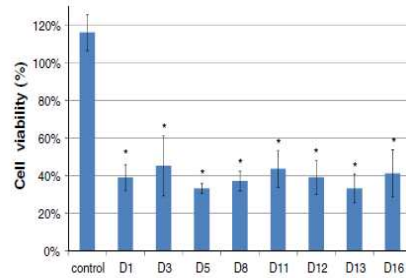
^a Percentage of identity and access number compared to GenBank sequences of isolates of this study; ND: Waiting for access number (sending to GenBank)

Table 2 Behavior of *Acanthamoeba* isolated from skin lesion and nasal mucosa of dogs at different temperatures and osmolarities

Isolate	Source	Temperature growth		Mannitol growth	
		37 °C	42 °C	0.5 M	1.0 M
D1	NM	+	-	+	-
D2	SL	+	-	+	-
D3	NM	+	-	+	-
D4	SL	+	-	+	-
D5	NM	+	-	+	-
D7	SL	+	-	+	+
D8	NM	+	-	+	-
D11	NM	+	-	+	-
D12	SL	+	-	+	+
D13	SL	+	-	+	+
D15	SL	+	-	+	+
D16	NM	+	-	+	-
D18	SL	+	-	+	-

+ viability or growth, - absence of growth, NM nasal mucosa, SL skin lesion

30 °C, with 0.5 M mannitol; none of the isolates grew at 42 °C. The isolates that grew with mannitol at 1 M (D7, D12, D13, D15, and D18) were considered to have low pathogenic potential, and the remaining isolates (D1, D2, D3, D4, D5, D8, D11, and D16)—which did not grow at 42 °C or with 1 M mannitol—were considered probably nonpathogenic. The in vitro growth of an *Acanthamoeba*

**Fig. 1** Cytopathic effect of *Acanthamoeba* isolates from nasal mucosa and lesion of dogs on VERO cell (* $P < 0.01$). Control only with VERO cells

isolate under relatively high osmotic stress or at a relatively high temperature can be related to virulence, since virulence is at least partially associated with an isolate's capacity to adapt and remain viable in the tissues of a mammalian host [17, 18]. Khan et al. [16] showed that pathogenic *Acanthamoeba* strains are temperature and osmolarity-tolerant compared to non-pathogens. Khan and Tareen [18] found that *Acanthamoeba* isolates can be differentiated based on osmolarity assays performed in the presence of 1 M mannitol. Some studies have found that pathogenic isolates of *Acanthamoeba* showed growth in increased temperatures and osmolarity, and that these physiological determinants can be used in the differentiation and prior characterization of the environmental and clinical isolates correlated to assays of their cytopathic effect in tissue cultures and in vivo infections [12, 18]. Strains of *Acanthamoeba* that can infect humans and other mammals must be capable of surviving at temperatures of 37 °C and slightly higher body temperatures. Different species may be thermotolerant but nonpathogenic, making thermotolerance a necessary but insufficient condition for the determination of pathogenicity. Our present findings demonstrated that eight *Acanthamoeba* isolates from nasal mucosa (D1, D3, D5, D8, D11, and D16) and skin lesions of dogs (D12 and D13) had a cytopathic effect on VERO cells. The *Acanthamoeba* isolates (4×10^4 mL⁻¹) significantly decreased the viability of VERO cells compared with the control, ranging from 55 to 67% (mean 61%), but there was no statistically significant difference among the isolates in CPE ($F = 12.5249$) $P < 0.01$ (Fig. 1). Takaoka-Sugihara et al. [36] demonstrated that all of the *Acanthamoeba* strains isolated from *Acanthamoeba* keratitis patients had a cytopathic effect on human corneal fibroblasts, and that this cytopathic effect was due to a direct adhesion to corneal fibroblasts rather than to soluble factors. Interestingly, six *Acanthamoeba* isolates (D1, D3, D5, D8, D11, and D16) that had CPE, did not grow in 1 M

mannitol or at 42 °C (Table 2). Thus, the isolates that would be considered nonpathogenic according to thermotolerance and osmotolerance parameters, may show pathogenic potential as revealed by CPE. In our study we determined that the presence of isolates with CPE. Although we cannot assert that these skin lesions had *Acanthamoeba* as the causal agent, lesions may serve as a gateway for this organism to access other organs by the hematogenous route, which could also occur with isolates from nasal mucosa through the respiratory pathway. Therefore, *Acanthamoeba* may have veterinary clinical significance.

Acknowledgments The authors thank CAPES and CNPq for financial support, the Microbiology, Immunology, and Parasitology Department of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil, and Dr. Janet W. Reid who revised the English text.

References

- Ayers KM, Billups LH, Garner FM (1972) *Acanthamoebiasis* in a dog. *Vet Pathol* 9:221–226
- Bauer RW, Harrison LR, Waton CW, Styer EL, Chapman WL Jr (1993) Isolation of *Acanthamoeba* sp. from a greyhound with pneumonia and granulomatous amebic encephalitis. *J Vet Diagn Invest* 5:386–391
- Booton GC, Rogerson A, Bonilla TD, Seal DV, Kelly DJ, Beattie TK, Tomlinson A, Lares-Villa F, Fuerst PA, Byers TJ (2004) Molecular and physiological evaluation of subtropical environmental isolates of *Acanthamoeba* spp., causal agent of *Acanthamoeba* keratitis. *J Eukaryot Microbiol* 51:192–200
- Brofman PJ, Knostman KAD, Bartola SP (2003) Granulomatous amebic meningoencephalitis causing the syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone in a dog. *J Vet Intern Med* 17(2):230–234
- Carlesso AM, Artuso GL, Caumo K, Rott MB (2010) Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. *Curr Microbiol* 60:185–190
- Caumo K, Frasson AP, Pens CJ et al (2009) Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the Southern Brazilian city of Porto Alegre. *Ann Trop Med Parasitol* 103:477–485
- Caumo K, Rott MB (2011) *Acanthamoeba* T3, T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. *Acta Trop* 117:233–235
- Corsaro D, Venditti D (2010) Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitol Res* 107(1):233–238
- De Carli GA (2001) *Parasitologia Clínica Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para Diagnóstico das Parasitoses Humanas*. São Paulo, Atheneu, pp 418–426
- Dubey JP, Benson JE, Blakeley KT, Booton GC, Visvesvara GS (2005) Disseminated *Acanthamoeba* sp. infection in a dog. *Vet Parasitol* 128(3–4):183–187
- Gast RJ (2001) Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. *J Eukaryot Microbiol* 48(6):609–615
- Gianinazzi C, Schild M, Zumkehr B et al (2010) Screening of Swiss hot spring resorts for potentially pathogenic free-living amoebae. *Exp Parasitol* 126:45–53
- Hodge PJ, Kelers K, Gasser RB, Visvesvara GS, Martig S, Long SN (2011) Another case of canine amoebic meningoencephalitis—the challenges of reaching a rapid diagnosis. *Parasitol Res* 108:1069–1073
- Ithoi I, Mahmud R, Abdul Basher MH, Jali A, Abdulsalam AM, Ibrahim J, Mak JW (2013) *Acanthamoeba* genotype T4 detected in naturally-infected feline corneas found to be in homology with those causing human keratitis. *Trop Biomed* 30:131–140
- Kadlec V (1978) The occurrence of amphizoic amoebae in domestic animals. *J Protozool* 25:235–237
- Khan NA (2006) *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev* 30:564–595
- Khan NA, Jarroll EL, Paget TA (2001) *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. *Curr Microbiol* 43:204–208
- Khan NA, Tareen NK (2003) Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and pathogenicity-based categorisation of *Acanthamoeba* strains. *Folia Parasitol (Prague)* 50:97–104
- Kinde H, Read DH, Daft BM, Manzer M, Nordhausen RW, Kelly DJ, Fuerst PA, Booton G, Visvesvara GS (2007) Infections caused by pathogenic free-living amoebae (*Balamuthia mandrillaris* and *Acanthamoeba* sp.) in horses. *J Vet Diagn Invest* 19:317–322
- Landell MF, Salton J, Caumo K, Broetto L, Rott MB (2013) Isolation and genotyping of free-living environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. from bromeliads in Southern Brazil. *Exp Parasitol* 134:290–294
- Lorenzo-Morales J, Ortega-Rivas A, Foronda P, Martínez E, Valladares B (2005) Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitol Res* 95:273–277
- Maghsoud AH, Sissons J, Rezaian M, Nolder D, Warhurst D, Khan NA (2005) *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *J Med Microbiol* 54:755–759
- Martinez AJ, Visvesvara GS (1997) Free-living amphizoic and opportunistic amoebae. *Brain Pathol* 7(1):583–598
- McConnell EE, Garner FM, Kirk JH (1968) Hartmannellosis in a bull. *Pathol Vet* 5:1–6
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 65:55–63
- Otta DA, Rott MR, Carlesso AM, Da Silva OS (2012) Prevalence of *Acanthamoeba* spp. (Sargomastigophora: Acanthamoebidae) in wild populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 111:2017–2022
- Page FC (1988) A new key to freshwater and soil gymnamoebae with instructions for culture. Freshwater Biological Association, Ambleside
- Pearce JR, Powell HS, Chandler FW, Visvesvara GS (1985) Amebic meningoencephalitis caused by *Acanthamoeba castellanii* in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 187:951–952
- Qvarnstrom Y, Neraid TA, Visvesvara GS (2013) Characterization of New Pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., Isolated from a Human with Fatal Amoebic Encephalitis. *J Eukaryot Microbiol* doi:10.1111/jeu.12069
- Salah M, Iciar M (1997) Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR based techniques. *Nucleic Acids Res* 25:4692–4693
- Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszli I, Seal DV, Markus MB, Fuerst PA, Byers TJ (2001) Use of subgenetic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol* 39:1903–1911
- Schuster FL (2002) Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 15:342–354

33. Schuster FL, Visvesvara GS (2004) Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 34:1001–1027
34. Siddiqui R, Khan NA (2012) Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors* 5:6
35. Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodriguez-Zaragoza S, Dean CL, Fuerst PA, Byers TJ (1998) The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J Eukaryot Microbiol* 45:45–54
36. Takaoka-Sugihara N, Yamagami S, Yokoo S, Matsubar M, Yagita K (2012) Cytopathic effect of *Acanthamoeba* on human corneal fibroblasts. *Mol Vis* 18:2221–2228
37. Taylor PW (1997) Isolation and experimental infection of free-living amoebae in freshwater fishes. *J Parasitol* 63:232–237
38. Visvesvara GS (1999) Pathogenic and opportunistic free-living amoebae. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC (eds) *Manual of clinical microbiology*, 7th edn. ASM Press, Washington, DC, pp 1383–1390
39. Winck MAT, Caumo K, Rott MB (2011) Prevalence of *Acanthamoeba* from tap water in Rio Grande do Sul, Brazil. *Curr Microbiol* 63:464–469

CAPÍTULO II

<http://aem.asm.org/>

Applied and Environmental
Microbiology

Manuscript Submission
and Peer Review System

[home](#) | [help for authors](#) | [help for reviewers](#) | [contact AEM™ staff](#) | [AEM™ home](#) | [logout](#)

Manuscript #	AEM00952-14
Current Revision #	0
Submission Date	2014-03-18 09:50:07
Current Stage	Manuscript Withdrawn
Title	Bacterial Endosymbionts in Acanthamoeba Isolates from the Nasal Mucosa and Cutaneous Lesions of Dogs
Running Title	Endosymbionts in Acanthamoeba Isolates from Dogs
Manuscript Type	Full-length text
Journal Section	Environmental Microbiology
Corresponding Author	Mrs. Ana Maris Carlesso (UFRGS)
Contributing Authors	Ms. Nicolle Lima Barbieri , Roberta S Reis , Amanda Carvalho , Dr. Fabiana Horn , Márcia B. Mentz , Marilise B. Rott
Abstract	Acanthamoeba hosts diverse microbial organisms some of which are potential human and animal pathogens. Increased in recent years studies on the interactions between microorganisms and Acanthamoeba, mainly to understand how certain bacteria resist to phagocytosis of their hosts and the reason of the pathogenicity of both is changed in function of these interactions. In this study 14 samples of Acanthamoeba of the genotypes T3, T4, T5 and T16 were investigated for bacterial presence. All isolates of Acanthamoeba contained at least 1 bacteria endosymbiont. One isolate contained 4 endosymbionts. Isolates of Acanthamoeba hosted Legionella pneumophila (79%), Mycobacterium (50%), Pseudomonas (79%), Enterobacteriaceae (57%), bacteria that are commonly involved in severe diseases. This is the first report of isolation of Acanthamoeba as a host of resistant bacteria isolated from dogs clinical samples.
Editor	Not Assigned
Suggested Reviewers to Include	Naveed Khan (University of London), M. F. Filat (University of Zaragoza), Francine Marciano-Cabral (Virginia Commonwealth University)
Suggested Reviewers to Exclude	N/A
Keywords	Amoeba, endosymbionts, clinical isolates
Research Areas	Veterinary Microbiology, Clinical Microbiology, Environmental Microbiology
Conflict of Interest	No conflict of interest.
Funding Sources	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
Color Charges	Yes, I agree to pay the color charges.
Electronic Forms	'the color charges will be paid.' 1 of 1 forms complete - View Electronic Forms Status

Bacterial Endosymbionts in *Acanthamoeba* Isolates from the Nasal Mucosa and Cutaneous Lesions of Dogs

Carlesso A.M.¹, Barbieri N.², Reis R.², A. Carvalho¹, Horn F.², M. B. Mentz¹, M. B. Rott^{1*}.

¹Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. ²Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding Autor:

M. B. Rott e-mail: marilise.rott@ufrgs.br

A. M. Carlesso e-mail: anacarlesso@yahoo.com.br

ABSTRACT

Acanthamoeba hosts diverse microbial organisms some of which are pathogens to human and animal. Increased in recent years studies on the interactions between microorganisms and *Acanthamoeba*, mainly to understand how certain bacteria resist to phagocytosis of their hosts and the reason of the pathogenicity of both is changed in function of these interactions. In this study 14 samples of *Acanthamoeba* of the genotypes T3, T4, T5 and T16, from the nasal mucosa and cutaneous lesions of dogs were investigated for bacterial presence. All isolates of *Acanthamoeba* contained at least 1 bacteria endosymbiont. One isolate contained 4 endosymbionts. Isolates of *Acanthamoeba* hosted *Legionella pneumophila* (79%), *Mycobacterium* (50%), *Pseudomonas* (79%), Enterobacteriaceae (57%), bacteria that are commonly involved in severe diseases. This is the first report of isolation of *Acanthamoeba* as a host of resistant bacteria isolated from dog clinical samples.

1. INTRODUCTION

Acanthamoeba spp. is an important predator that controls microbial communities at environment. It is ubiquitous and has been isolated from various natural sources such as freshwater, salt water, soil, dust and air (8, 12, 32). *Acanthamoeba* spp. also has been isolated from the nasal mucosa, cutaneous lesions and brain of humans and animals (10, 13). *Acanthamoeba* spp. is able to infect the skin, brain and the lungs producing disseminated infections in susceptible hosts, but is more frequently associated to keratitis caused by the use of contact lenses (39, 40, 42). Several bacteria have developed mechanisms to survive to phagocytosis by *Acanthamoeba*.

Transient association with amoebae has been reported for a number of different bacteria including *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp. and Enterobacteriaceae, among others (2, 3, 9, 11, 14, 35). As most of these bacteria are pathogens in humans and animals, amoebae have been suggested to represent their environmental reservoirs, acting as “Trojan horses” of the microbial world (1, 6, 37). There are several reports that pathogenic

bacteria internalized in *Acanthamoeba* cysts could survive in many different environments and more easily survive in unfavorable conditions such as high temperatures, antibiotic therapy or treatment with disinfectants (4, 31, 36). Bacteria have been shown to maintain a stable interaction with their hosts and are able to outlast in encysted amoebae (46).

L. pneumophila is a gram-negative facultative intracellular bacillus responsible for Legionnaires' disease. It replicates within evolutionarily distant eukaryotic host cells such as protozoa and mammalian macrophages (3, 27) Furthermore, *Legionellae* have been co-isolated from protozoa or have been found in typical habitats of free-living protozoa, such as freshwater environments and moist soil (3, 7, 9, 14, 18, 20, 28). Infection of amebas by *Legionella* enhances bacterial propagation in several ways and it is considered to be the central of the pathogenesis and ecology of *L. pneumophila* (15, 16, 23, 43).

Mycobacteria are a large group of microorganisms that inhabit a diverse range of natural environments. Environmental mycobacteria are a frequent cause of opportunistic infection in human and livestock animals. *Mycobacterium* spp. shown to survive in *Acanthamoeba*. However, neither bacterial multiplication nor amoebal lysis occurred (4, 14, 47). The interactions between *M. avium* and *Acanthamoeba* were subsequently studied and demonstrated that the *M. avium* that grown within amoebae were more virulent than those grown in just broth medium. *M. avium* was also shown to survive within cyst walls of *Acanthamoeba* (14, 36, 46). On the other hand, the pathogenicity of ameba and bacterial may be enhanced when hosting bacteria, as shown for *Acanthamoeba* spp. naturally or artificially infected with bacterial endosymbionts. In fact, intracellular growth of *Mycobacterium* and *Legionella* in *Acanthamoeba* enhances invasiveness and virulence of the bacteria (14, 15, 16).

Pseudomonas spp. is also very frequent in natural and recreational waters, and this has also become increasingly recognized as an emerging opportunistic pathogen of clinical relevance.

Because of the intrinsic antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. and the emergent multidrug resistant strains, *Pseudomonas* is the first cause of hot tub folliculitis, keratitis and fatal pneumonia cases, both in hospitals and in the community (11, 33, 35). However, some *Pseudomonas* spp. evolved to become resistant to amoebae, as demonstrated by the isolation of *Acanthamoeba* naturally infected with *P. aeruginosa* (35).

Enterobacteriaceae are the most preferred nutrient sources of *Acanthamoeba*, *in vitro*. *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes* appeared to be a better nutrient source for amoebae. Interestingly, viable *E. coli* organisms provide a higher yield of trophozoites than do nonviable ones. Conversely, *E. coli* is able to multiply in the presence of *Acanthamoeba*. However, unlike *Legionella*, which multiplies within the trophozoites, the *E. coli* growth is also possible when the bacteria are separated from *Acanthamoeba* by a semipermeable membrane (2, 26, 48). One of the strategies used by pathogenic *E. coli* to survive in aquatic environments is to use free-living amoebae as hosts. It had been shown that to survive at environment, *E. coli* cohabited inside protozoa such as *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba castellanii* (2). In addition to enhanced environmental survival, bacterial cohabitation with protozoa could induce adaptive changes in bacteria (2). Although at the population or species level Enterobacteriaceae and *Acanthamoeba* spp. may be seen as mutualisms, at the individual level, the amoebae are better considered to be the predator of the Enterobacteriaceae. (1, 4, 31, 35, 36).

In this study, we describe the presence of endosymbionts in 14 strains of *Acanthamoeba* isolated from the nasal mucosa and cutaneous lesions collected of 48 dogs in Brazil. The endosymbiotic bacteria were characterized with the specific genes *mip* (*L. pneumophila*), *hsp65* (*Mycobacterium* spp.), 16S rDNA (*Pseudomonas* spp.) and *csgA* (Enterobacteriaceae) We also analysed the cytopathic effect of *Acanthamoeba* on VERO cells. This is the first report of isolation of *Acanthamoeba* as a host of resistant bacteria isolated from dog clinical samples.

2. MATERIAL AND METHODS

Ethics Statement

Experiments with dogs were performed in compliance with the guidelines of the Institutional Animal Care and Committee on Ethics of Animal Experimentation (“Comissão de Ética em Experimentação Animal”, national guidelines, Law number 11.794, 8/10/2008) from Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre- RS (approved protocol number 18631).

2.1 Clinical Samples

This study was designed in Porto Alegre, the capital city of Rio Grande do Sul State in Brazil. The dogs used were from the both sex, unknown ages and that attended to the Dermatology Department of the Hospital de Clínicas Veterinárias from Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Clinical samples were collected from nasal mucosa and skin lesion from dogs using sterile swabs for amoebae isolation.

2.2 Amoebae Culture

The isolation of amoebae was made in monoxenic culture containing non-nutrient agar 1.5 % with overlayer of *Escherichia coli* (ATCC 25922) suspension that had been heat inactivated (2 h at 56°C) (Page 1988). The isolates were cultured axenically in PYG medium (0.75 % (wt/vol) proteose peptone, 0.75 % (wt/vol) yeast extract, and 1.5 % glucose) supplemented with penicillin G potassium (400 IU/mL) and streptomycin (400 µL/mL) (45).

2.3. Enzymes and chemicals

For all PCR procedures, the primers were from IDT integrated technologies, Taq DNA polymerase was from CENBIOT (Porto Alegre, Brazil) and the 100–base pair DNA marker from Ludwig Biotec (Porto Alegre, Brazil).

2.2. Reference strains

Reference strains used as positive controls for PCR procedure: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 25618, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 ATCC 33152. The environmental (Neff—ATCC 30010) and clinical (T4—ATCC 50492) strains of *A. castellanii* were also used as reference.

2.4. Sample preparation

Genomic DNAs from the reference *L. pneumophila*, *M. tuberculosis* and *P. aeruginosa* were kindly donated by the Central IPB-LACEN/Laboratório-Porto Alegre-Brazil State. The *E. coli* bacterial DNA was obtained from whole organisms by boiling preparation (5). The *Acanthamoeba* DNA was obtained according Salah and Iciar, 1997 (44).

2.4. PCR bacterial detection:

In this study the bacteria were identified in isolates belonging to the genotypes T3, T4, T5 and T16 of *Acanthamoeba* obtained of cutaneous lesions and nasal mucosa of dogs. The presence of *csgA* was examined according to the method of Maurer et al, 1998, as an indicative to the presence of the *Enterobacter* bacterial family (*E. coli*, *E. ferrusonii*, *Enterobacter* sp., *Shigella flexneri*) (34). Briefly the reactions were performed in 25 µl containing 2.5 µl of 10X PCR buffer, 1.5 µl 50 mM MgCl₂, 2 U Taq DNA polymerase (CENBIOT), 0.5 µl 10 mM dNTP, 0.2 µl (100 pmol) of

each primer pair and 1 µl (40 ng) of DNA sample, in the following conditions: 94 °C for 5 min; 25 cycles at 94 °C for 30 sec, 55 °C for 30 sec, and 72 °C for 1 min; and a final extension of 72 °C for 10 min. The presence of *L. pneumophila*, *M. tuberculosis*, and *P. aeruginosa* were performed as described in (11) independent PCR reactions. Briefly, the PCR was performed in a final volume of 25 µl containing 1 µl of sample, 2.5 µl of 10X PCR buffer, 1.5 µl 50 mM MgCl₂, 2 U Taq DNA polymerase (CENBIOT), 0.5 µl 10 mM dNTP, 0.2 µl (100 pmol) of each primer pair and the corresponding primers (see Table 1). The reaction mixture was initially denatured at 94 °C for 5 min and then amplified for 25 cycles with denaturation at 94 °C for 1min, annealing at 45 °C for 1min, extension at 72 °C for 1 min and a final extension at 72 °C for 10 min. After, 5 µl of the amplification product obtained from corresponding PCR were diluted 1:10 with Milli-Q sterile water, and a 5 µl-aliquot was used as a template for the nested PCR performed in a final volume of 25 µl. The reaction mixture was initially denatured at 94 °C for 5 min and then amplified for 20 cycles with denaturation at 94 °C for 1min, annealing at 48 °C for 1 min, extension at 72 °C for 1 min and a final extension at 72 °C for 10 min. The results were monitored in a 2% agarose gel stained with ethidium bromide, 100 bp molecular weight marker and analysed in a UV transiluminator.

Table 1. – Oligonucleotides. Oligonucleotides sequences used in PCR

Target Bacteria	Primer	Sequence 5'-3'	Product (bp)
<i>Escherichia coli</i>	<i>csgA</i>	F ACTCTGACTTGACTATTACC R AGATGCAGTCTGGTCAAC	220
<i>Legionella pneumophila</i>	Mip-Leg186F Mip-Leg186R	F GCATTGGTGCCGATTGG R GYTTTGATCAAATCTTTCTGAA	186
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>N-Mip-dir</i> SN-Mip-rev	F GAA GCA ATG GCT AAA GGC ATG CAA R GCTTTGCCATCAAATCTT TCTGAAACTTG	112
<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>Hsp65-dir</i> Hsp65-dir	F CCCGTACGAGAAGATCGG R TCCTCGACGGTGATG	354
<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>N-Hsp65-dir</i> N-Hsp65-rev	F GAGCTGGTCAAGGAAGTCGCC R GTTGCCGACCTTGCCATCGC	300
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>R16S-dir</i> R16S-rev	F GGTCTGAGAGGATGATCAGT R TCTGTACCGACCATGTAGC	962
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>N-R16S-dir</i> N-R16S-rev	F GACGTTACCGACAGAATAAGCACCG R ACCCACATGCTCCACCGCTTGIG	476

2.5. Cytopathic Effect of *Acanthamoeba* on VERO Cells

The cytopathic effect (CPE) of *Acanthamoeba* isolates on VERO cells line (African Green Monkey Kidney, ATCC CCL-81) was evaluated by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay according Mosmann, 1983 (38). In brief the VERO cell line was cultured and maintained in complete Dulbecco's modified Eagle medium (i.e., DMEM supplemented with 10 % fetal bovine serum [GIBCO], 100 U/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin) 100 U/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin) at 37°C with 5 % CO₂. Cells were seeded at a concentration of 4.0 x 10⁴ cells per well on 96-well microplates and incubated for 24 h to form confluent monolayers. Then, the medium was removed and fresh DMEM with *Acanthamoeba* isolates 4 x 10⁴ (D1, D3, D4, D5, D7, D8, D11, D12, D13, and D16) were added to each wells in triplicate and incubated at 37°C for 24 h. After this time, 20 µL of MTT (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA) solution (3 mg/mL) was added to each well and incubated for a further 4 h. The supernatant was removed with untransformed MTT and 100µL of DMSO (Dimethyl sulfoxide) was added to each well for solubilizing formazan crystals, then, the optical density (OD) was measured in a Microplate reader (Benchmark BioRad) at 570 nm with a 620 nm reference filter. The amount of formazan produced was directly proportional to the number of living cells in culture.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The purpose of this study was to determine the presence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* isolates recovered from nasal mucosa and skin lesion of dogs and to assess their potential in the pathogenesis of the disease.

We searched for 4 different bacteria species, using PCR with specific primers for each bacteria, *Legionella pneumophilla*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, and *Enterobacteriaceae* to analyse if any of the amoebae isolates were hosting any of these bacteria as an endosymbiont.

We found that in the *Acanthamoeba* isolates (Table 1), all 14 (100%) were hosting at least 1 bacteria as endosymbionts, a more than the 59, 4% that were observed by Iovieno et al., 2010 (22) and the 63.9% observed by Calvo et al., 2013 (11), and were 4-fold greater than the 26% endosymbionts presence observed by Fritsche et al., 1993 (30). In this study we observed positivity for bacteria in all analyzed amoebae unlike the other results of the above observed studies. So we can conclude that the use of PCR technique may have improved our results. In the present study, we identified that 79% of the isolates (11 isolates) presented *L. pneumophila* (Fig 2) hosted inside *Acanthamoeba*. Other work from Calvo et al, 2013, isolated only 7.2% of *Legionella* in free living amoeba taken from different natural and anthropogenic water sources in Aragon (Spain) from January 2010 to August 2011 (11).

The microbial ecology of *L. pneumophila* is currently a topic of fundamental importance for the prevention of diseases caused by this microorganism, and many biological characteristics and environmental behaviours are still partially unknown (1, 18, 24, 29). The reason that *L. pneumophila* serogroup-1 is so predominant among clinical isolates is unknown, and little is known about the ecological factors influencing the distribution of *L.pneumophila* serogroups in the environment (20, 21, 28, 41). Environmental parameters as water temperature (29), presence of disinfectants, and microbial competitor, favouring factors as presence of biofilm and protozoa (19, 24, 31) may influence the presence and the spread of *L. pneumophila* serogroups.

The ubiquity of free living amoeba is a serious concern not only because of their potential virulence but also because they are reservoirs for resistant to protozoa bacteria that survive chlorination and others disinfection treatments.

Iovieno et al, 2010 isolated twenty-two (59.4%) of the 38 *Acanthamoeba* cultures from 12 (52.2%) of 23 patients examined yielded endosymbionts. *Chlamydia* was found in one patient and *Legionella* was found in corneal scrape and corneal button of three patients and an tap water environmental sample such as endosymbionts of *Acanthamoeba*. *Legionella* was not isolated from *Acanthamoeba* in contact lens or lens case (30). Here, we observed *Pseudomonas* in 11 *Acanthamoeba* isolates (Fig 3). In the study of Iovieno et al, 2010 found *Pseudomonas* species in 13 sample of 6 patients observed in 5 of corneal scrape and 8 of contact lenses or lens cases of *Acanthamoeba* isolates (30). Calvo et al, 2013 observed 26.1% of the free living amoebas isolates taken from different natural and anthropogenic water sources hosting *Pseudomonas* (11). Also we analyse the presence of *Mycobacterium* in *Acanthamoeba* isolates.

We found 7 isolates hosting *Mycobacterium* (Fig 4). A previous study showed that 4 patients (5 *Acanthamoeba* isolates: 3 of corneal and 2 contact lenses) and 1 environmental isolate with *Mycobacterium* genes. *Mycobacterium* has been previously reported as endosymbionts in an environmental *Acanthamoeba* isolate (38). Calvo et al., 2013 showed a higher presence of *Mycobacterium* spp., that was detected in 36.9% of the samples (11). The present study was the first to report *Mycobacteria* in clinical dog samples.

The presence of *csgA* gene was examined according to the method of Maurer et al, (1998) to identify Enterobacteriaceae (34). We found Enterobacteriaceae in 8 of the *Acanthamoeba* isolates (Fig 5).

Enterobacteriaceae are among the preferred nutrient sources of free living amoebae. This explains why *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., and *E. coli* are preferred for amoebal enrichment procedures (45). Interestingly, viable *E. coli* organisms provide a higher yield of trophozoites than do nonviable. To isolate amoebae from clinical samples plates with agar non-nutrient covered with *Escherichia coli* heat killed were used. In light of this, we could not rule out that *Acanthamoeba*

isolated from dogs were already housing *E.coli* when they were isolated *in vitro*. Yousuf et al, 2013 used a keratitis isolate of *A. castellanii* of the T4 genotype and studied its interactions with two bacterial genera, which have not been tested before, *Enterobacter aerogenes* and *Aeromonas hydrophila*, as well as *E. coli*, (48). That was the first time the findings revealed that *A. hydrophila* and *E. aerogenes* were associated and survived inside *A.castellanii* trophozoites and cysts. Both *A. hydrophila* and *E. aerogenes* remained viable during the encystment process and multiplied.

Unlike the results of other authors, in our research we isolated *L. pneumophila* and *Pseudomonas* in greater number followed by, *Mycobacterium* and Enterobacteriaceae. In our study we observed the persistence of gram negative bacteria within trophozoites and cysts (Fig 1). *Acanthamoeba* were isolated 3 years ago of dogs and still harbor pathogenic bacteria. It suggests that *Acanthamoeba* can be stored and still carry pathogenic bacteria for a long time.

Nevertheless, *Acanthamoeba* are feed with bacteria by phagocytosis, in attempting to speculated if amoeba and bacteria are involved in interactions of the clinical specimens, we tested the cytopathic effect (CPE) of *Acanthamoeba* isolates using VERO cells line (African Green Monkey Kidney) *in vitro*. The CPE on VERO cells demonstrated that 8 *Acanthamoeba* isolates from nasal mucosa and skin lesions of dogs had a higher cytopathic effect. *Acanthamoeba* isolates significantly decreased the viability of VERO cells. Because of all *Acanthamoeba* isolates possessed one or more bacterias, we could not observe if the presence or absence of endosymbionts in isolates from *Acanthamoeba* increase or not the pathogenicity of amoebae. Iovieno et al. 2010, observed a significantly higher cytotoxic effect for *Acanthamoeba* hosting endosymbionts compared with isolates without endosymbionts. Also, *Pseudomonas* and *Mycobacterium* enhanced *Acanthamoeba* CPE significantly more than *Legionella* (30).

Endosymbionts may influence *Acanthamoeba* pathogenicity, virulence, or susceptibility to antiamebic drugs. An enhancement of *Acanthamoeba* cytopathogenicity after the acquisition of

bacterial endosymbionts has been described *in vitro* (23). The presence of the endosymbiont may modify *Acanthamoeba* phenotype, making the protozoa more pathogenic or resistant to therapy. Conversely, *Acanthamoeba* can affect endosymbionts pathogenicity. In fact, intracellular growth of *Mycobacterium* and *Legionella* in *Acanthamoeba* enhances invasiveness and virulence of the bacteria (14, 15, 16, 23).

Acanthamoeba also can protect endosymbiont bacteria from antibiotics, disinfectant, and hostile environmental conditions (31, 36). Glaser et al, 2011 described the isolation of a *Mycobacterium* from *Acanthamoeba castellanii* strain Ma (ATCCs50370TM). (*Acanthamoeba castellanii* strain Ma (ATCCs50370TM) was isolated from a case of keratitis in New York in 1978 (Ma et al.1981) and deposited in ATCC.

Although bacteria–*Acanthamoeba* symbiosis has been reported and analyzed in multiple studies, the real contribution of endosymbionts to the pathogenesis of amoebal infections has not been clarified yet.

In present study *Acanthamoeba* was isolated three years ago of dogs and still remains with endosymbionts. It is in agreement with the study of Glaser and colleagues, 2011 (25). In present study *Acanthamoeba* was isolated three years ago of dogs and still remains cytotoxic to VERO cells. On the other hand, the standard strains (T4 and Neff) and that were grown to more than 10 years in our laboratory lost their pathogenicity. There are perviously reports that repeated subcultures strains of *Acanthamoeba* ATCCs (17), reduced their virulence, It is in agreement with our findings, because our ATCCs showed no cytopathic effect in VERO cells (data not shown). But it is not clear how many subcultures are needs to lose its pathogenicity.

In summary our paper showed that, all 14 isolates of *Acanthamoeba* contained at least 1 bacterium as endosymbiont, and one isolate contained all the 4 endosymbionts. We observed that 79% of the isolates of *Acanthamoeba* hosts *Legionella pneumophila*, 50 % hosts *Mycobacterium*,

79% hosts *Pseudomonas* and 57% hosts Enterobacteriaceae. And also the CPE on VERO cells demonstrated that 8 *Acanthamoeba* isolates had a high cytopathic effect. This is the first report of isolation of *Acanthamoeba* as a host of resistant bacteria isolated from dog clinical samples.



Figure 1. *Acanthamoeba* strains isolated from dogs with Gram negative bacteria therein (arrow). Cyst isolated from the cutaneous lesion (A). Trophozoite isolated from cutaneous lesion of two dogs (B and C). Bars 5 μ . 1000X.

Table 2- Genotypic characterization of isolates found in dogs in RS Brazil. Endosymbionts and Cytopathic effect of *Acanthamoeba* isolates from nasal mucosa and lesion of dogs on VERO cells

Source isolates <i>Acanthamoeba</i>	GenBank accession	Genotype	Reference sequences	Identit ^a (%)	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>	Enterobacteriaceae	Cytopathic effect
NM	KF054072	T16	GQ342607.1	93	+	-	-	-	+
SL	KF054073	T4	JF702896.1	99	-	+	+	+	ND
NM	KF054074	T4	JX104341.1	97	+	-	+	-	+
SL	KF054075	T5	AB741044.2	98	ND	ND	ND	ND	ND
NM	KF962051	T3	HQ236519.1	98	+	-	+	+	+
SL	KF054076	T4	JX043490.1	93	-	-	+	+	+
NM	KF962049	T5	AB741044.2	98	+	+	+	-	+
NM	ND	ND	ND	ND	-	+	-	+	
SL	KF054078	T3	S81337.1	99	+	-	+	-	+
SL	KF962050	T5	AB741044.2	96	+	+	+	-	+
SL	KF962052	T5	AB741044.2	96	+	-	-	+	+
SL	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+	ND
SL	KF962048	T3	KC694191.1	99	+	+	+	+	ND
NM	KF054077	T4	HM036176.1	98	+	-	+	-	+
SL	KF962047	T4	AF019052.1	98	+	+	+	+	ND
Environment	ND		ND		+	+	-	+	-
Keratitis	Genbank		Genbank		+	+	+	+	-

A: Percentage of identity and access number compared to GenBank sequences of isolates of this study; ND: was not done. NM nasal mucosa, SL: skin lesion

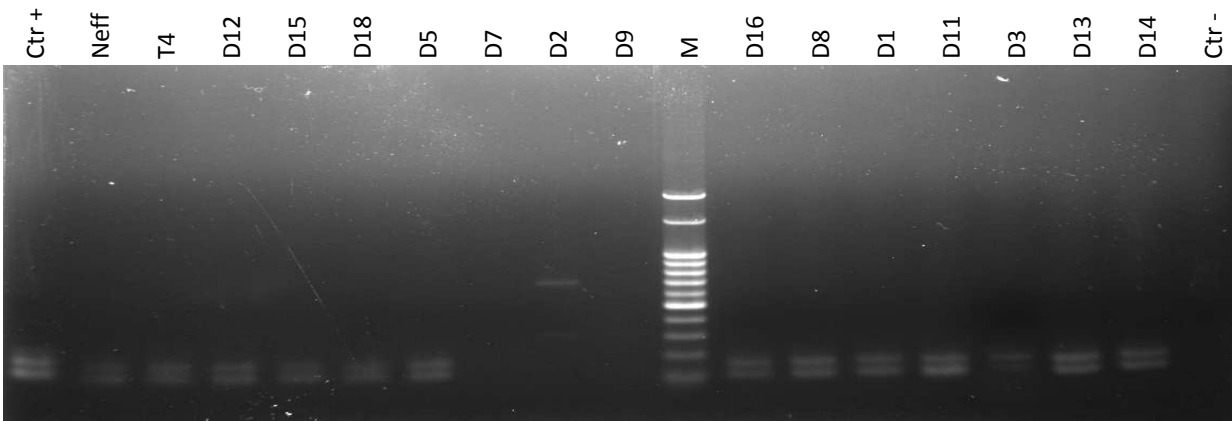


Figure 2 *Legionella pneumophila* PCR amplification. The DNA obtained from the whole organism of *Acanthamoebae* samples were amplified for the *mip* gene (112 bp).

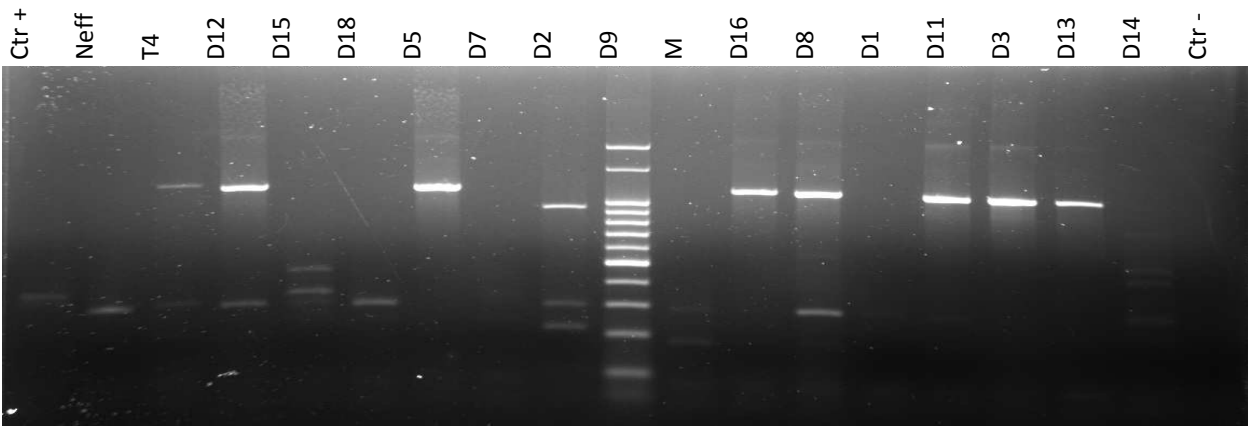


Figure 3 *Mycobacterium* PCR amplification. The DNA obtained from the whole organism of *Acanthamoebae* samples were amplified for the *hsp65* gene (300 bp).

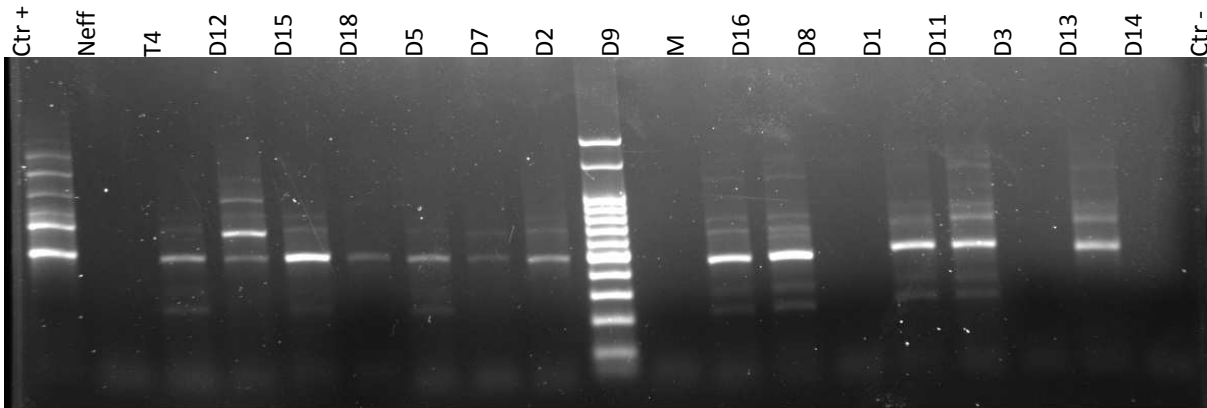


Figure 4 *Pseudomonas* PCR amplification. The DNA obtained from the whole organism of *Acanthamoebae* samples were amplified for the R16S gene (476 bp).

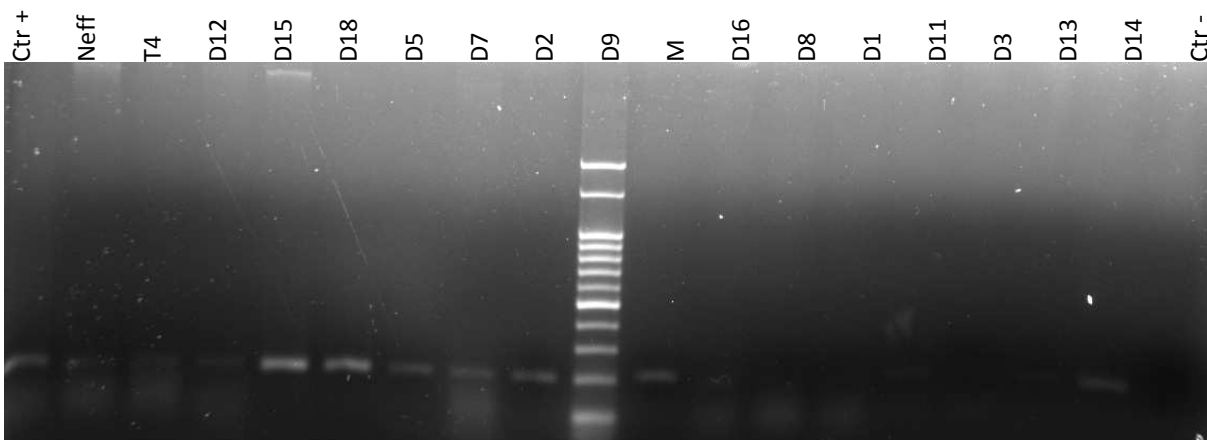


Figure 5 *Enterobacteriaceae* PCR amplification. The DNA obtained from the whole organism of *Acanthamoebae* samples were amplified for the *csgA* gene (220 bp).

4. References

- 1- Abu Kwaik, Y., L.-Y. Gao, B. J. Stone, C. Venkataraman, and O. S. Harb. 1998. Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3127–3133.
- 2- Alsam S, Jeong SR, Sissons J, Dudley R, Kim KS & Khan NA (2006) *Escherichia coli* interactions with *Acanthamoeba*: a symbiosis with environmental
- 3- Anacarso I, Guerrieri E, Bondi M, de Niederhausern S, Iseppi R, Sabia C et al (2010) Influence of *Legionella pneumophila* and other water bacteria on the survival and growth of *Acanthamoeba polyphaga*. *Arch Microbiol* 192:877–882
- 4- Archuleta, R. J., P. Mullens, and T. P. Primm. 2002. The relationship of temperature to desiccation and starvation tolerance of the *Mycobacterium avium* complex. *Arch. Microbiol.* 178:311–314.
- 5- Barbieri NL, Tejkowski TM, Oliveira AL, Brito BG, Horn F (2012) Characterization of extra-intestinal *Escherichia coli* isolated from a peacock (*Pavo cristatus*) with colisepticemia. *Avian Diseases* 56: 436-440.
- 6- Barker, J., and M. R. Brown. 1994. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* 140:1253–1259. .
- 7- Berk, S. G., R. S. Ting, G. W. Turner, and R. J. Ashburn. 1998. Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:279–286. .
- 8- Booton GC, Rogerson A, Bonilla TD, Seal DV, Kelly DJ, Beattie TK, Tomlinson A, Lares-Villa F, Fuerst PA, Byers TJ (2004) Molecular and physiological evaluation of subtropical environmental isolates of *Acanthamoeba* spp., causal agent of *Acanthamoeba* keratitis. *J Eukaryot Microbiol* 51:192–200
- 9- Bozue, J. A., and W. Johnson. 1996. Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect. Immun.* 64:668–673.
- 10-Cabello-Vílchez AM, Martín-Navarro CM, López-Arencia A, Reyes-Batlle M, González AC, Guerra H, Gotuzzo E, Valladares B, Piñero JE, Lorenzo-Morales J. Genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains isolated from nasal swabs of healthy individuals in Peru. *Acta Trop.* 2013 Oct 17;130C:7-10.
- 11- Calvo L, Gregorio I, García A, Fernández MT, Goñi P, et al. (2013) A new pentaplex-nested PCR to detect five pathogenic bacteria in free living amoebae. *Water Research* 47: 493-502.
- 12-Carlesso AM, Artuso GL, Caumo K, Rott MB (2010) Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. *Curr Microbiol* 60:185–190

- 13-Carlesso AM, Mentz MB, Machado da M LS, Carvalho A, Nunes TTE, Maschio VJ, Rott MB. Characterization of Isolates of *Acanthamoeba* from the Nasal Mucosa and Cutaneous Lesions of Dogs. *Curr Microbiol* 2014.
- 14- Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS, Bermudez LE. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun* 1997;65:3759–67.
- 15-Cirillo JD, Cirillo SL, Yan L, et al. Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 1999;67:4427–34.
- 16- Cirillo, J. D., L. S. Tompkins, and S. Falkow. 1994. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect. Immun.* 62:3254–3261
- 17- De Jonckheere. J.F. Growth Characteristics, Cytopathic Effect in Cell Culture, and Virulence in Mice of 36 Type Strains Belonging to 19 Different *Acanthamoeba* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. Apri. 1980. p. 681-685 Vol. 39, No. 4
- 18-Declerck, P., Behets, J., van Hoef, V., Ollevier, F., 2007. Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Water Research* 41 (14), 3159-3167.
- 19-Declerck P (2010) Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol* 12:557–566.
- 20-Den Boer JW, Bruin JP, Verhoef LP, Van der Zwaluw K, Jansen R, Yzerman EP (2008) Genotypic comparison of clinical *Legionella* isolates and patient-related environmental isolates in The Netherlands, 2002–2006. *Clin Microbiol Infect* 14:459–466 .
- 21-Doleans A, Aurell H, Reyrolle M, Lina G, Freney J, Vandenesch F et al (2004) Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. *J Clin Microbiol* 42:458–460.
- 22-Fritsche, T. R., R. K. Gautom, S. Seyedirashti, D. L. Bergeron, and T. D. Lindquist. 1993. Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. *J. Clin. Microbiol.* 31:1122–1126.
- 23- Fritsche TR, Sobek D, Gautom RK. Enhancement of in vitro cytopathogenicity by *Acanthamoeba* spp. following acquisition of bacterial endosymbionts. *FEMS Microbiol Lett* 1998;166:231– 6.
- 24-Gião MS, Azevedo NF, Wilks SA, Vieira MJ, Keevil CW (2011) Interaction of *Legionella pneumophila* and *Helicobacter pylori* with bacterial species isolated from drinking water biofilms. *BMC Microbiol* 11:57.
- 25-Glaser K, Hetrick Nd, And Molestina RE. Evidence for a Previously Unrecognize Mycobacterial Endosymbiont in *Acanthamoeba castellanii* Strain Ma (ATCCs50370TM). *J. Eukaryot. Microbiol.*, 58(1), 2011 pp. 75–76

- 26-Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:413–33.
- 27- Harb, O. S., L. Y. Gao, and K. Y. Abu. 2000. From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. *Environ. Microbiol.* 2:251–265.
- 28- Harrison TG, Doshi N, Fry NK, Joseph CA (2007) Comparison of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* obtained in the UK over 19 years. *Clin Microbiol Infect* 13:78–85.
- 29- Hrubá L, 2009. The colonization of hot water systems by *Legionella*. *Ann Agric Environ Med* 16:115–119.
- 30-Iovieno, A, Ledee, D.R, Miller, D, Alfonso, E.C, 2010. Detection of bacterial endosymbionts in clinical *Acanthamoeba* isolates. *Ophthalmology* 117 (3), 445 e 452.
- 31-Kilvington S, Price J, 1990. Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J Appl Bacteriol*;68:519 –25.
- 32-Lorenzo-Morales, J., A. Ortega-Rivas, E. Martínez, M. Khoubbane, P. Artigas, M. V. Periago, P. Foronda, N. Abreu-Acosta, B. Valladares, and S. Mas-Coma. 2006. *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental freshwater samples in the Nile Delta region, Egypt. *Acta Trop.* 100:63-69.
- 33- Lutz, J.K., Lee, J., 2011. Prevalence and antimicrobial-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools and hot tubs. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8 (2), 554 e 564.
- 34- Maurer JJ, Brown TP, Steffens WL, Thayer SG (1998) The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin Tsh among avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases* 42: 106-118.
- 35-Michel, R., H. Burghardt, and H. Bergmann. 1995. *Acanthamoeba*, naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital. *Zentralbl, Hyg. Umweltmed.* 196:532–544.
- 36- Miltner, E. C., and L. E. Bermudez. 2000. *Mycobacterium avium* grown in *Acanthamoeba castellanii* is protected from the effects of antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:1990–1994.
- 37- Molmeret M, Horn M, Wagner M, Santic M and Kwaik YA. Amoebae as Training Grounds for Intracellular Bacterial Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, Jan. 2005, p. 20–28 Vol. 71, No. 1.
- 38- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 65:55–63

- 39-Nuprasert, W.; Putaporntip, C.; Pariyakanok, L.; Jongwutiwes, S. Identification of a Novel T17 Genotype of *Acanthamoeba* from Environmental Isolates and T10 Genotype Causing Keratitis in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48(12), p. 4636–4640, 2010. . OK
- 40-Pasricha, G., S. Sharma, P. Garg, and R. K. Aggarwal. 2003. Use of 18S rRNA gene-based PCR assay for diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers in India. *J. Clin. Microbiol.* 41:3206-3211.
- 41-Patrizia M, Annalisa B, Anacarso I, Marchesi I, Niederha^o S, Moreno B. Protozoa and human macrophages infection by *Legionella pneumophila* environmental strains belonging to different serogroups. *Arch Microbiol* (2013) 195:89–96.
- 42-Qvarnstrom, Y; Nerad, TA.; Visvesvara, GS. Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. *J. of Eukaryotic Microbiol* v 60 626-633, 2013.
- 43- Rowbotham, T. J. 1986. Current views on the relationships between amoebae, *legionella* and man. *Isr. J. Med. Sci.* 22:678–689. .
- 44- Salah M, Iciar M (1997) Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR based techniques. *Nucleic Acids Res* 25:4692–4693
- 45-Schuster FL (2002) Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin Microbiol Rev* 15:342–354
- 46-Steinert M, Birkness K, White E, et al. Mycobacterium avium bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:2256–61.
- 47- Yu HS, Jeong HJ, Hong YC, et al. Natural occurrence of *Mycobacterium* as an endosymbiont of *Acanthamoeba* isolated from a contact lens storage case. *Korean J Parasitol* 2007;45:11– 8.
- 48- Yousuf FA, Siddiqui R and Khan NA. *Acanthamoeba castellanii* of the T4 genotype is a potential environmental host for *Enterobacter aerogenes* and *Aeromonas hydrophila* *Parasites & Vectors* 2013, 6:16

CAPÍTULO III

Investigation of the interaction of *Acanthamoeba* spp. with Murine Macrophages J774.A1

Introduction

Acanthamoeba, one of free-living amoebae widely distributed in nature, are known to cause opportunistic diseases such as encephalitis, keratitis and skin lesions (Marciano-Gabral, 2003). Its body has microprojections called acanthopodium, which are responsible for the adherence to biological or inert surfaces, cell movement and prey capture. During trophozoitic stage, *Acanthamoeba* feeds bacteria, algae, fungi or small organic particles, and many of visible vacuoles in the cytoplasm of power cells (Khan, 2006). *Acanthamoeba* and macrophages share remarkable similarities in their cellular structure (morphological and ultra-structural features), molecular motility, biochemical physiology, ability to capture prey by phagocytosis and interactions with microbial pathogens (Siddiqui and Khan, 2012).

Acanthamoeba pathogenesis is highly complex and involves several steps. However, adherence to host cells is a crucial step in the pathogenesis of *Acanthamoeba* infections (Panjwana, N. 2010). Secondary events are supposed to be triggered by contact, such as proteases secretion that leads to cytopathic effects, interference with host cell signalling pathways or host cell death by phagocytosis or apoptosis (Denecker et al, 2001; Ferrante, A. 1991). Macrophages are known to be the front line of defense in many infectious diseases and, although the molecular mechanism against *Acanthamoeba* during ocular infection is poorly understood, histological studies showed that macrophages are abundant during the early stages of infection (Klink et al, 1996; Marciano-Cabral and Cabral, 2003).

Our main goal was to investigate the interaction between *Acanthamoeba* spp. isolated from clinical samples of dogs and J774.A1 murine macrophages. Here we evaluate the capacity of association between *Acanthamoeba* spp. J774.A1 and macrophages by adhesion assay.

Materials and Methods

Acanthamoeba spp. isolates belonging to the genotypes T3, T4, T5 and T16 were originally isolated from skin lesions and nasal mucosa of dogs, and *Acanthamoeba castellanii* genotype T4 (ATCC 50492) and Neff (ATCC 30010) were kindly donated by Dr. Naveed A Khan. All parasites strains were grown, as axenic cultures, in 0.75% (wt/vol), peptone 0.75%, (wt/vol), yeast extract and 1.5% glucose (PYG) and supplemented with penicillin G potassium (400IU/mL) and streptomycin (400 μ L/mL) at 30°C (Schuster, 2002).

Murine macrophages cell lines J774.A1, purchased from Rio de Janeiro Cell Bank, were maintained in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) containing 1% L-glutamina and 10% fetal calf serum at 37°C, 5% CO₂.

Adherence assay: Adherence assay was performed in 24-well plates by using 2×10^5 macrophages cells per well. *Acanthamoeba* trophozoites were washed 3 times in phosphate buffer saline (PBS) and resuspended in DMEM without FCS. Parasites were added to the confluent macrophages monolayers in a MOI of 1. The coculture was incubated at 37°C, 5% CO₂ and adherence was measured after 1 h. The supernatant containing the unbounded amoebae were gently removed by washing 1 time with PBS. Unbound parasites were counted using Neubauer chamber. The percentage of unbound amoebae was calculated as follow: number of unbound amoebae/ total number of amoebae x 100% unbound amoebae. We assumed that the percentage of bound amoebae is 100% - % unbound amoebae. All assays were repeated in biological and technical triplicate.

Giemsa staining: Adherence assay was performed as described above. Following incubation, confluent cells over glass coverslips were washed 3 times with PBS and stained with Giemsa stain for 20 min. Coverslips were analyzed by Light Microscopy

Results and Discussion

The objective of this preliminary study was to analyze the adherence of macrophages with *Acanthamoeba* isolates of samples clinical of dogs. There have been few studies to assess the interaction of *Acanthamoeba* with specified cells of the immune system. Studies in laboratory with experimental animals such as mice exposed to *Acanthamoeba* have shown that neutrophils and macrophages are the major inflammatory cells to migrate into the area of infection. Macrophages may play a more important role than neutrophils in killing *Acanthamoeba*, but both neutrophils and activated macrophages are capable of killing trophozoites and cysts in vitro. (Clarke et al, 2006; Hurt et al, 2001; Marciano-Cabral F, Toney, 1998; Niederkorn et al, 1994; Ferrante A, Abell TJ, 1986)

Here we show that all strains studied highly adhere to macrophages in an average rate of 70% (Figures 1 and 2). Although Marciano-Cabral and Toney (1998) correlated pathogenicity of some *Acanthamoeba* strains with *in vitro* destruction of macrophage cultures, we could not observe this distinction in our study.

Acanthamoeba trophozoites injured macrophages by lysis and by ingestion. However, macrophages activated with immunomodulators in vivo or with bacterial lipopolysaccharide (LPS) and gamma interferon (IFN- γ) in vitro were not killed as readily by *Acanthamoeba* as were primary resident peritoneal macrophages or untreated macrophage cell lines. Rather, activated macrophage cultures were capable of limited destruction of *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba*

castellanii by contact-dependent cytolysis and by ingesting *Acanthamoeba*. In our work, 1 hour of adhesion seemed to be enough to start the macrophage ingestion (Figure 3).

The adherence is not associated with heat-susceptible molecules and even is dependent to viability of parasite, since we evaluate adhesion with heat-killed *Acanthamoeba* and no difference in binding percentage was perceived (data not shown). Studies are in progress to determine whether this interaction is dependent mannose receptors, if the *Acanthamoeba* spp. are cytotoxic for macrophages and to check if the infection with *Acanthamoeba* spp. results in the death of macrophages.

References

- 1- Clarke DW, Alizadeh H and Niederkorn JY. Intracorneal Instillation of Latex Beads Induces Macrophage-Dependent Protection against *Acanthamoeba* Keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2006, Vol. 47, No. 11. 4917-4925
- 2-De Jonckheere. J.F. Growth Characteristics, Cytopathic Effect in Cell Culture, and Virulence in Mice of 36 Type Strains Belonging to 19 Different *Acanthamoeba* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. April. 1980. p. 681-685 Vol. 39, No. 4
- 3- Denecker, G., W. Declercq, C.A.W. Geuijen, A. Boland, R. Benabdillah, M. van Gurp, M-P. Sory, P. Vandenabeele, G.R. Cornelis (2001). *Yersinia enterocolitica* YopP-induced apoptosis of macrophages involves the apoptotic signalling cascade upstream of Bid. *J. Biol. Chem.* 276:19706-14.
- 4- Ferrante, A. 1991. Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. *Parasite Immunol.* 13:31-47.
- 5- Ferrante A, Abell TJ. Conditioned medium from stimulated mononuclear leukocytes augments human neutrophil-mediated killing of a virulent *Acanthamoeba* sp. *Infect Immun.* 1986;51:607-617.
- 6- Glaser K, Hetrick Nd, And Molestina RE. Evidence for a Previously Unrecognized Mycobacterial Endosymbiont in *Acanthamoeba castellanii* Strain Ma (ATCCs50370TM). *J. Eukaryot. Microbiol.*, 58(1), 2011 pp. 75-76
- 7- Hurt M, Apte S, Leher H, et al. Exacerbation of *Acanthamoeba* keratitis in animals treated with anti-macrophage inflammatory protein 2 or antineutrophil antibodies. *Infect Immun.* 2001;69: 2988-2995.
- 8- Marciano-Cabral F, Toney DM. The interaction of *Acanthamoeba* spp. with activated macrophages and with macrophage cell lines. *J Eukaryot Microbiol.* 1998; 45:452-458
- 9- Marciano-Cabral, F.; Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. *Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology.* **16**: 273-307.
- 11- Niederkorn J, Alizadeh H, Taylor W, et al. Oral immunization induces protective immunity against *Acanthamoeba* keratitis. In: Nussenblatt R, Whitcup SM, Caspi RR, Gery I, eds. *Advances in Ocular Immunology.* 1994:281-284
- 12- Klink FV, Taylor WM, Alizadeh H, et al. The role of macrophages in *Acanthamoeba* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996; 37: 1271-1281.
- 13- Khan, N. A. (2006). *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiological Review.* **30**: 564-595.
- 14- Panjwana, N. (2010). Pathogenesis of *Acanthamoeba* Keratitis. *Ocul Surf.* **8**(2): 70-79.

14- Schuster, F. L. (2002). Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 342-354.

15- Siddiqui R, Khan NA. *Acanthamoeba* is an evolutionary ancestor of macrophages: A myth or reality? *Experimental Parasitology* 130 (2012) 95–97

15- Stewart GL, Shupe K, Kim I, et al. Antibody-dependent neutrophil mediated killing of *Acanthamoeba castellanii*. *Int J Parasitol.* 1994; 24:739–742.

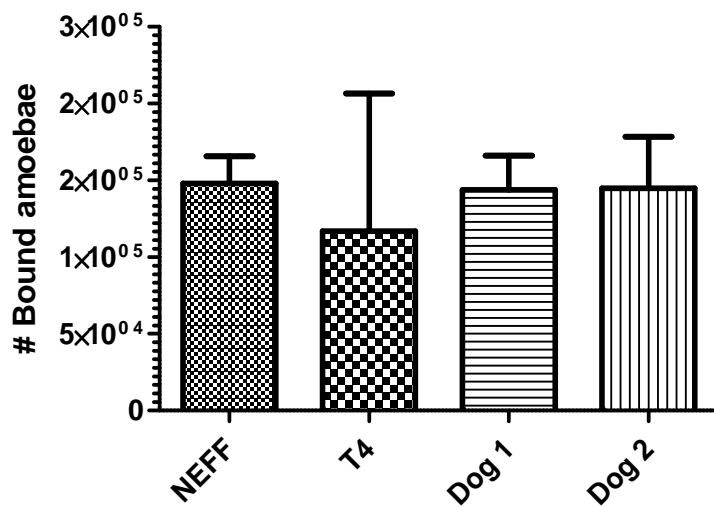


Figure 1. Number of absolute amoebae adhered with macrophages in 1h of incubation 37°C a 5% of CO_2 Neff and T4 (ATCC). Dog 1 (T3) and Dog 2 (T4) (Samples).

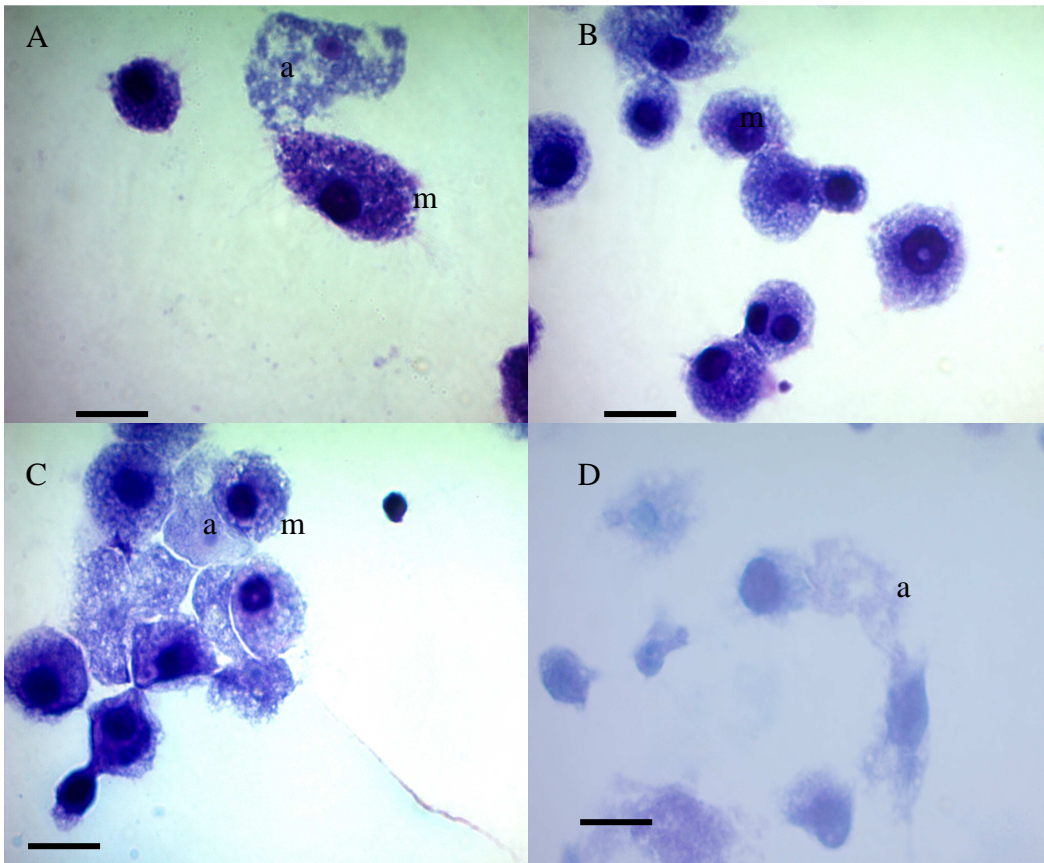


Figure 2. Giemsa staining: Interaction of macrophages (m) with *Acanthamoeba* spp. (a). (A) Shows trophozoites of *Acanthamoeba* adhered to the macrophages after 1 hour. (B) Shows only macrophages. (C) *Acanthamoeba* shaping the macrophage. (D) Shows surrounding *Acanthamoeba* possibly starting phagocytosis. Bars 5 μ . Magnification is 100X.

4. DISCUSSÃO GERAL

Acanthamoeba é um gênero de AVL, amplamente distribuído nos mais diversos ambientes, e também o mais envolvido em doenças graves em seres humanos e animais.

As amostras para o isolamento e a caracterização de *Acanthamoeba* spp., do presente estudo foram obtidas em clínica de dermatologia animal a partir de cães com lesões de pele. Os animais na grande maioria eram levados ao hospital de clínicas veterinárias (HCV-UFRGS) pelos seus proprietários para realizar consulta com médico veterinário dermatologista. Os proprietários assinaram termo de consentimento (anexo na presente tese) antes das coletas, e subsequentemente as amostras foram enviadas ao laboratório de parasitologia – ICBS- UFRGS. De 46 cães foram coletadas 2 amostras de cada animal, uma de lesão cutânea e outra da mucosa nasal, resultando em 98 amostras. Após o isolamento de AVL em meio monoxênico, clonagem, axenização foi realizado PCR, seguido do sequenciamento para definir os genótipos.

Das 98 amostras analisadas, 14 foram confirmados pela PCR, usando como alvo o gene do 18S DNA, como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* spp. Dos isolados obtidos, 13 tiveram os genótipos determinados como: T3 (3 amostras), T4 (5 amostras), T5 (4 amostras) e T16 (1 amostra), este último foi isolado pela primeira vez de amostra clínica até então tinha sido isolado do meio ambiente.

De 8 isolados axênicos foi determinado o efeito citopático sobre células VERO, resultados mostraram que estes isolados apresentaram efeito citopático, enquanto as 4 cepas ATCC de *Acanthamoeba* pp. mantidas em nosso laboratório não apresentaram este mesmo efeito. Todos isolados de *Acanthamoeba* cresceram a 37°C e em ágar manitol 0,5M, enquanto somente 4 cresceram a 1M e nenhum cesceu a 42°C. Podemos observar que somente estes fatores não são indicadores de patogenicidade para *Acanthamoeba*. O fato de todos os isolados terem apresentado

crescimento à temperatura de 37°C, que é a temperatura corporal da maioria dos mamíferos, indica que poderiam estar bem adaptados aos animais, podendo representar risco para infecções por *Acanthamoeba* ou por microrganismos carreados por este protozoário.

Kadlec (1978) examinando amostras de animais domésticos, encontrou 15 espécies e cepas de AVL que estavam presentes em seus corpos. *Hartmannella vermiformis*, foi isolada a partir dos brônquios de um cão e vários isolados de *Acanthamoeba* do prepúcio de um touro, vagina de uma vaca e fígado de um coelho. McConnell e colaboradores (1968) descreveram um caso de *Hartmannella* (*Acanthamoeba*) infectando os pulmões de um touro, cujo modo de entrada no organismo do animal foi atribuído à inalação do protozoário ou por extensão direta de uma infecção nasal inaparente.

Nos isolados de *Acanthamoeba* utilizados no presente estudo foram pesquisados endossimbiontes através da PCR. Oligonucleotídeos específicos foram usados para *L. pneumophila*, *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e Enterobacteriaceae. Verificou-se a presença de bactérias em 14 dos isolados analisados, os quais continham pelo menos uma espécie bacteriana e um dos isolado continha todos os quatro endossimbiontes pesquisados. Observou-se que 79% dos isolados de *Acanthamoeba* albergava *Legionella pneumophila*, 50% *Mycobacterium* spp., 79% *Pseudomonas aeruginosa* e 57% Enterobacteriaceae.

Kilvington e Price (1990) observaram que *Acanthamoeba* poderia proteger as bactérias endossimbiontes de antibióticos, desinfetantes e condições ambientais hostis. Podemos assim sugerir que as lesões presentes nos cães dos quais foram coletadas as amostras de nosso estudo, poderiam na realidade tratar-se de infecções secundárias, provocadas pelas bactérias endossimbiontes presentes nas amebas isoladas e que as amebas apenas estivessem servindo como “carreadoras” das mesmas, não sendo estas amebas as responsáveis pelas lesões. Podemos ainda sugerir que as bactérias internalizadas em *Acanthamoeba* estariam protegidas de fatores externos

como antibioticoterapia ou outro tratamento, tornando difícil a cura de algumas doenças desses animais.

Glaser e colaboradores (2011) descreveram a presença de *Mycobacterium* spp. internalizada em *Acanthamoeba castellanii* ATCC que está depositada no Genbank. Este é o primeiro relato de isolamento de *Acanthamoeba* spp. como um hospedeiro de bactérias endossimbiontes, isoladas a partir de amostras clínicas, em nosso grupo de pesquisa e igualmente o primeiro estudo na América Latina.

Marciano-Cabral e Toney (1998) correlacionaram a patogenicidade de *Acanthamoeba* em co-cultivo com macrófagos para determinar se macrófagos ativados poderiam destruir *Acanthamoeba culbertsoni*. Trofozoítos de *Acanthamoeba* destruíram os macrófagos (sem ativação) por lise e por ingestão. No entanto, os macrófagos ativados com imunomoduladores *in vivo* ou com o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e interferon gama (IFN- γ) *in vitro* não foram mortos por *Acanthamoeba*. Em vez disso, culturas de macrófagos ativados são capazes de causar a destruição limitada de *Acanthamoeba polyphaga* e *Acanthamoeba castellanii* por citólise dependente do contato e pela ingestão de *Acanthamoeba*.

Os isolados de *Acanthamoeba* deste estudo foram co-cultivados com macrófagos o que resultou na aderência em apenas 1h de contato. Observamos que não houve diferença significativa na adesão quando *Acanthamoeba* foi inativada pelo calor confirmando que *Acanthamoeba* é contato dependente, corroborando com os resultados encontrados por Marciano-Cabral e Toney (1998). Mais estudos são necessários para determinar se esta interação depende de receptores de manose, se os trofozoítos de *Acanthamoeba* são citotóxicos para os macrófagos e se a infecção por *Acanthamoeba* resulta em morte de macrófagos.

5. CONCLUSÕES

O genótipo de 13 isolados obtidos de amostras clínicas de cães na cidade de Porto Alegre, foram caracterizados a partir do sequenciamento da região 18S do rDNA. Estes isolados uma vez caracterizados e disponíveis no laboratório poderão servir de base para outros estudos. A determinação correta da taxonomia é um fator essencial para que se possa chegar a generalizações acerca da ecologia, patogenicidade e epidemiologia de *Acanthamoeba* spp. Os isolados de *Acanthamoeba* spp. do presente estudo pertencem aos genótipos T3, T4, T5 e T16. Neste estudo o genótipo T16 foi isolado pela primeira vez em amostra clínica (mucosa nasal).

Também foi verificado que este genótipo apresentou efeito citopático sobre células VERO e bactérias foram identificadas internalizadas neste isolado. Pode-se concluir que o genótipo T16 apresenta características que correspondem a um organismo potencialmente patogênico. Isolados de *Acanthamoeba* spp. de 8 de cães apresentaram efeito citopático sobre células de mamíferos (VERO) e estes isolados também cresceram a 37°C e a 0,5M de manitol e somente 2 cresceram a 1M e nenhum isolado cresceu a 42°C. Podemos concluir que usando apenas os testes de osmo e termotolerância não são suficientes para verificar a patogenicidade de *Acanthamoeba* spp., sendo necessário verificar o teste de efeito citopático em células de mamíferos.

As bactérias identificadas, no presente estudo, como endossimbiontes estavam presentes em todos isolados de *Acanthamoeba* spp. as quais foram: *L. pneumophila*, *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e Enterobacteriaceae. O isolamento de *Acanthamoeba* spp. da presente tese, foi realizado no ano de 2011, as cepas ATCC utilizadas como controle nos experimentos vem sendo cultivadas por um período maior e ainda assim os endossimbiontes encontravam-se presentes no interior de todas as amebas. Isto nos permite concluir que o tempo que os endossimbiontes permanecem internalizados em amebas pode ser muito longo.

Os isolados de *Acanthamoeba* spp. do presente estudo, apesar do tempo sendo cultivados em laboratório, ainda permanecem patogênicos. As cepas ATCC usadas como controle, mesmo com bactérias patogênicas internalizadas, não tiveram efeito citopático sobre as células VERO, provavelmente devido à atenuação de sua virulência em função do tempo que vem sendo mantidas em cultivo. Concluímos através da análise da interação de macrófagos com os isolados usados neste trabalho, que *Acanthamoeba* adere facilmente aos macrófagos.

Em suma, este trabalho serve como base para posteriores estudos que são necessários para entender os fatores de virulência associados à patogenicidade de *Acanthamoeba* spp.

6. PERSPECTIVAS

A interação dos isolados de *Acanthamoeba* e macrófagos foi um projeto piloto, são necessários esclarecimentos a respeito desta interação; Assim, as perspectivas deste trabalho incluem:

- Testar se essa interação é dependente de receptores de manose;
- Testar se *Acanthamoeba* spp. são citotóxicas para os macrófagos;
- Verificar se a infecção por *Acanthamoeba* spp. resulta na morte de macrófagos.

7. ANEXOS

ANEXO 1

Descarte de resíduos

Os resíduos biológicos serão descartados de acordo com as normas do departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia pertencente ao ICBS. Resíduos biológicos, como meio de cultura, serão autoclavados e descartados em lixo infectante (se for mantida a forma original), ou em lixo orgânico comum (se não for possível identificar a forma original). Outros resíduos potencialmente contaminados com agente biológico, tais como algodão, gaze e luvas, serão acondicionados em saco de lixo infectante e armazenados em local específico no ICBS até o recolhimento por empresa credenciada junto a UFRGS. Todos os resíduos químicos gerados no projeto serão segregados de acordo com as orientações do Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos (CGTRQ – IQ-UFRGS) e recolhidos pelo mesmo.

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO DO USO ANIMAL

Eu, _____ (nacionalidade) _____ endereço:

estou permitindo a participação do meu animal em um estudo denominado: **OCORRENCIA DE AMEBAS DE VIDA LIVRE EM CAES NA CIDADE DE PORTO ALEGRE, RS.**, cujos objetivos e justificativas são: **Amebas de vida livre (AVL), são consideradas como patógenos em potencial, mesmo assim, existem até o momento, poucos relatos a respeito. Deste modo faz-se necessário a pesquisa e o isolamento destes protozoários, pois podem causar Encefalite Amebiana que é uma doença crônica, na maioria das vezes fatal e foi relatada em animais incluindo cães. A porta de entrada de AVL em seu hospedeiro, ocorrem pela inalação de poeira ou solo contaminado com amebas ou através de lesões na pele, justificando o modelo animal escolhido que é o cão e o local a ser retirado o material biológico. Assim, na ausência de dados sobre estes protozoários emergentes em nosso meio e o presente projeto se propõem a pesquisar a ocorrência de AVL em cães da cidade de Porto Alegre, RS.**

A participação do meu cão no referido estudo será no sentido de **coletar amostras da pele com lesão e da mucosa nasal com suabe estéril.**

Recebi também os esclarecimentos necessários **sobre a ausência de risco e a possibilidade do cão apresentar um leve desconforto durante a coleta do suabe nasal, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente seram obtidos após a sua realização.** Estou ciente de que o meu animal será atendido, respeitado e receberá os cuidados necessários.

Também fui informado de que posso recusar a participação do meu animal no estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que o meu animal estiver recebendo.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são:

1. MÁRCIA BOHRER MENTZ – PROFESSOR ADJUNTO DO DEMIP/ICBS/UFRGS

2. MARILISE BRITTES ROTT PROFESSOR ASSOCIADO DO DEMIP/ICBS/UFRGS

3. ANA MARIS CARLESSO – ALUNO DE DOUTORADO DO PPG-MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE/ DEMIP/ICBS/UFRGS

4. MAURO LUIS SILVA MACHADO – MÉDICO VETERINÁRIO DO HCV- UFRGS

e com eles poderei manter contato pelos telefones: 33084537 e 33083584

É assegurado o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo. Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre **consentimento** em permitir a participação do cão, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, pela participação do meu animal.

Nome e assinatura do proprietário do animal da pesquisa

Nome(s) e assinatura(s) do(s) pesquisador (es) responsável (responsáveis)

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELEKE, A. A. et al. *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp.nov. and *Legionella fallonii* sp.nov.: three unusual new Legionella species. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 51, n. 3, p. 1151–60, Mai 2001.

AYERS KM, BILLUPS LH, GARNER FM Acanthamoebiasis in a dog. **Vet Pathol** 9:221–226, 1972.

BARKER, J. et al. Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2420-25, Ago 1992. ISSN 0099-2240

BARKER, J., BROWN, M. R. Trojan Horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. **Microbiology**, v. 140, n. 6, p. 1253-59, Jun 1994.

BARKER, J., SCAIFE, H., BROWN, M. R. Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 12, p. 2684-88, Dez 1995. ISSN 0066-4804

BAUER RW, HARRISON LR, C, WATSON W, STYER E, LCHAPMAN, W. L JR. Isolation of *Acanthamoeba* sp. from a greyhound with pneumonia and granulomatous amebic encephalitis. **J Vet Diagn Invest** 5:386-391, 1993.

BOZUE, J. A., JOHNSON, W. Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. **Infection and immunity**, v. 64, n. 2, p. 668-73, Fev 1996. ISSN 0019-9567

BUCHNER, P. Endosymbiose der Tiere mit Pflanzlichen Mikroorganismen. **Gebundene Ausgabe**, Basel, Switzerland ,1953.

CASTELLANI, A. An amoeba found in culture of yeast: preliminary note. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 33, p. 160, 1930.

CARLESSO AM, et al. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. **Curr Microbiol**, 60:185–190, Mar 2010.

CARLESSO AM, et al. Characterization of Isolates of *Acanthamoeba* from the Nasal Mucosa and Cutaneous Lesions of Dogs. **Curr Microbiol**, 68:702–707, Feb 2014.

CAUMO, K. et al. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 103, n. 6, p. 477-85, Sep 2009.

CDC. Increasing incidence of Legionellosis in the United States. **Morb Mortal Wkly Rep.** v. 60, n. 32, p. 1083-6, Ago 2011.

CIANCIOTTO, N. P., FIELDS, B. S. *Legionella pneumophila mip* gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v. 89, n. 11, p. 5188-91. Jun 1992.

CIRILLO, J. D., FALKOW, S., TOMPKINS, L. S. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. **Infection and immunity**, v. 62, n. 8, p. 3254-61, Ago 1994.

CIRILLO, J. D. et al. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. **Infection and immunity**, v. 65, n. 9, p. 3759-67. Set 1997.

CIRILLO, J. D. et al. Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 9, p. 4427-34, Set 1999.

CORSARO, D. et al. Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 213, n. 3, p. 158-66, Jun 2010.

CULBERTSON, C. G.; SMITH, J. W.; MINNER, J. R. *Acanthamoeba*: observations on animal pathogenicity. **Science**, v. 127, n. 3313, p. 1506, Jun 27 1958. 0036-8075 (Linking).

CULBERTSON, C. G. The pathogenicity of soil amoebas. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 25, p. 231-254, 1971.

DAFT B. M. et al. Seasonal Meningoencephalitis in Holstein Cattle Caused by *Naegleria Fowleri*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 6 605-609, Nov 2005.

DE JONCKHEERE. J. F. Growth Characteristics, Cytopathic Effect in Cell Culture, and Virulence in Mice of 36 Type Strains Belonging to 19 Different *Acanthamoeba* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 681-685, April 1980.

DE JONCKHEERE J. F. A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. **Acta Protozool**, v41:309–342, 2002.

DUNNEBACKE, T. H. et al. *Balamuthia mandrillaris* from soil samples. **Microbiology** 150: 2837–284, 2004.

FERRANTE A, BATES EJ: Elastase in the pathogenic free-living amoebae, *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp. **Infect Immun** 1988, 56:3320-1c, B. S. et al. Virulence of *Legionella anisa* strain associated with Pontiac fever: an evaluation using protozoan, cell culture, and guinea pig models. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 9, p. 3139-42. Set 1990.

FIELDS, B. S.; BENSON, R. F.; BESSER, R. E. *Legionella* and legionnaires' disease: 25 years of investigation. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 3, p. 506-26, Jul 2002.

FRITSCH, T. R.; SOBEK, D.; GAUTOM, R. K. Enhancement of *in vitro* cytopathogenicity by *Acanthamoeba* spp. following acquisition of bacterial endosymbionts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 166, n. 2, p. 231-6, Set 1998.

FRY, N. K. et al. Direct amplification and sequencing of the 16S ribosomal DNA of an intracellular *Legionella* species recovered by amebal enrichment from the sputum of a patient with pneumonia. **FEMS Microbiology Letters**, v. 83, n. 2, p. 165-8, Out 1991.

GAO, L. Y.; HARB, O. S.; ABU KWAIK, Y. Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 11, p. 4738-46, Nov 1997.

GARATE M, CAO Z, BATEMAN E, PANJWANI N: Cloning and characterization of a novel mannose-binding protein of *Acanthamoeba*. **J Biol Chem**, v. 49, n. 56, p. 279-298, 2004.

GAST, R. J.; BYERS, T. J. Genus- and subgenus-specific oligonucleotide probes for *Acanthamoeba*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 71, n. 2, p. 255-60, May 1995.

GELMAN, B. B. et al. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. In: (Ed.). **JAMA**. United States, v. 285 p.2450-1, 2001.

GLASER K.; HETRICK N. D.; AND MOLESTINA R. E. Evidence for a Previously Unrecognized Mycobacterial Endosymbiont in *Acanthamoeba castellanii* Strain Ma (ATCCs50370TM). **J. Eukaryot. Microbiol**, v. 58(1), pp. 75–76, 2011.

GOBBO, P. N. et al. *Legionella micdadei* pneumonia in normal hosts. **Lancet**, v. 2, n. 8513, p. 969, Out 1986.

GÓMEZ-COUSO, H.; PANIAGUA-CRESPO, E.; ARES-MAZÁS, E. *Acanthamoeba* as a temporal vehicle of *Cryptosporidium*. **Parasitology research**, v. 100, n. 5, p. 1151-4, Abr 2007.

GREUB, G.; RAOULT, D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 413-33, Abr 2004.

HARB, O. S.; L. Y. GAO; K. Y. ABU. From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. **Environ. Microbiol**, v. 2, p. 251–265, 2000.

HILBI, H. et al. Environmental predators as models for bacterial pathogenesis. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 563-75, Mar 2007.

JONES, B.R.; VISVESVARA, G.S.; ROBINSON, N.M. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. **Trans. Ophthalmol**, v. 95, p. 221–232, 1975.

KADLEC V. The occurrence of amphizoic amoebae in domestic animals. **J Protozool**, v. 25, p. 235–237, 1978.

KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. Federation of European Microbiological Societies. **Microbiological Review**, v.30, p. 564-595, 2006.

KILVINGTON S, PRICE J. Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. **J Appl Bacteriol**, v. 68, p. 519-25, 1990.

KING, C. H. et al. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 3023-33. Dez 1988.

LA SCOLA, B. et al. A giant virus in amoebae. **Science**, v. 299, n. 5615, p. 2033, Mar 2003.

LORENZO-MORALES J. et al. Therapeutic potential of a combination of two gene-specific small interfering RNAs against clinical strains of *Acanthamoeba*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 54, p. 5151–5155, 2010.

LORENZO-MORALES, J. et al. *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? **Trends Parasitol**, v. 29, n. 4, p. 181-7, Apr 2013.

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

MARRIE, T. J. et al. *Legionella*-like and other amoebal pathogens as agents of community-acquired pneumonia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1026-9, Dez 2001.

MARTINEZ, A. J.; VISVESVARA, G. S. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. **Brain Pathol**, v. 7, n. 1, p. 583-98, Jan 1997.

MAURIN, M. et al. Phagolysosomes of *Coxiella burnetii*-infected cell lines maintain an acidic pH during persistent infection. **Infect. Immun**, v. 60, n. 12, p. 5013-6, Dez 1992.

MCNALLY, C. et al. Potential importance of *Legionella* species as etiologies in community acquired pneumonia (CAP). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 38, n. 2, p. 79-82, Out 2000.

MICHEL, R. et al. *Legionella*-like slender rods multiplying within a strain of *Acanthamoeba* sp. isolated from drinking water. **Parasitol Res**, v. 84, n. 1, p. 84-8. 1998.

MILTNER, E. C.; BERMUDEZ, L. E. *Mycobacterium avium* grown in *Acanthamoeba castellanii* is protected from the effects of antimicrobials. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 7, p. 1990-4, Jul 2000.

MORTAZAVI P. N. et al.: Possible roles of phospholipase A2 in the biological activities of *Acanthamoeba castellanii* (T4 genotype). **Protist**, v. 76, p. 162-168, 2011.

NAGINGTON, J. et al. Amoebic infections of the eye. **Lancet**, v. 28, n. 2, p. 1537-1540, Dec 1974.

OFORI-KWAKYE, S. K. Granulomatous brain tumor caused by *Acanthamoeba*. Case report. **J. Neurosurg**, v. 64, p. 505-509, 1986.

OTTA D. A. et al. Prevalence of *Acanthamoeba* spp. (Sargomastigophora: Acanthamoebidae) in wild populations of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). **Parasito Res**, v. 111, p. 2017–2022, 2012.

PAGE, F. C. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. **J Protozool**, v. 14, n. 4, p. 709-24, Nov 1967.

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

PANJWANI N: Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. **Ocul Surf**, v. 8, p.70-9, 2010.

PATRIZIA M, et al. Protozoa and human macrophages infection by *Legionella pneumophila* environmental strains belonging to different serogroups. **Arch Microbiol**, v. 195, p. 89–96, 2013.

PEARCE J. R. et al. Amebic meningoencephalitis caused by *Acanthamoeba castellanii* in a dog. **J Am Vet Med Assoc**, v. 187, p. 951–952, 1985.

PETRY F. et al. Early diagnosis of *Acanthamoeba* infection during routine cytological examination of cerebrospinal fluid. **J Clin Microbiol**, v. 44, p. 1903–1904, 2006.

PUSHKAREW, B. M. Uber die Verbreitung der Susswasser-protozoen durch die Luft.**Arch. Protistent.**, v. 23, p. 323–362, 1913.

PUSSARD, M.; PONS, R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). **Protistologica**, Dijon, v. 13, n. 4, 557-598, 1977.

RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S. Ecology of free-living amoebae. **Crit review in microbiol**, v. 20, n. 3, p. 225-41. 1994.

ROWBOTHAM, T. J. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. **J of Clin Pathol**, v. 33, n. 12, p. 1179-83, Dez 1980.

SCHUSTER, F.L., DUNNEBACKE, T.H., BOOTON, G.C., YAGI, S., KOHLMEIER, C.K. GLASER, C., VUGIA, D., BAKARDJIEV, A., AZIMI, P., MADDUX-GONZALEZ, M., MARTINEZ, A.J. and Visvesvara G.S. Environmental Isolation of *Balamuthia mandrillaris* Associated with a Case of Amebic Encephalitis. **J. Clin.Microbiol.** 41: 3175–3180, 2003.

SCHUSTER, F.L.; VISVESVARA, G.S. Amebae And Ciliated Protozoa As Causal Agents Of Waterborne Zoonotic Disease. **Veterinary Parasitology**, 126: 91-120, 2004(a)

SCHUSTER, F.L.; VISVESVARA, G.S. Free-Living Amoebae as Opportunistic And Non-Opportunistic Pathogens Of Humans And Animals. **J. Parasitology**, 34: 1001-1027, 2004(b).

SEGAL, G., SHUMAN, H. *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. **infect Immun**, v. 67, n. 5, p. 2117-24. Mai 1999. ISSN 0019-9567.

SIDDIQUI R, KHAN NA. *Acanthamoeba* is an evolutionary ancestor of macrophages: A myth or reality? **Exp Parasitol**, 130 95–97, 2012.

SINGHAL, T., T., A. BAJPAI, V. KALRA, S. K. KABRA, J. C SAMANTARAY, G. SATPATHY, AND A. K. GUPTA. Successful treatment of *Acanthamoeba* meningitis with combination oral antimicrobials. **Pediatr Infect Dis J**, 20:623-627, 2001.

SISSONS J, ALSAM S, JAYASEKERA S, KHAN NA: Ecto-ATPases of clinical and non-clinical isolates of *Acanthamoeba*. **Microb Pathog**, 37:231-9, 2004.

STEINERT, M. et al. Mycobacterium avium bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. **Appl Environ Microbiol**, v. 64, n. 6, p. 2256-61. Jun 1998. ISSN 0099-2240.

STOTHARD, D. R. et al. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. **J Eukaryot Microbiol**, v. 45, n. 1, p. 45-54, 1998 Jan-Feb 1998.

STOUT, J. E., YU, V. L., BEST, M. G. Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution systems. **Appl Environ Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 221-8. Jan 1985. ISSN 0099-2240.

TOBIN, J. O. et al. Legionnaires' disease in a transplant unit: isolation of the causative agent from shower baths. **Lancet**, v. 19; 2, n. 8186, p. 118-21. Jul 1980.

VISVESVARA, G. S. Classification of *Acanthamoeba*. **Rev Infect Dis**, v. 13 Suppl 5, p. S369-72, Apr 1991. ISSN 0162-0886.

VISVESVARA GS; MAGUIRE JH. Pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **Tropical Infectious Diseases**, v. 2, p. 1114–1125, 2006.

VISVESVARA GS. Pathogenic and Opportunistic Amebae. **Manual of Clinical Microbiology**, 9th ed. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Washington DC: ASM Press. 2007. p. 2082-91.

VISVESVARA GS. Amebic meningoencephalitis and keratitis: challenges in diagnosis and treatment. **Curr Opin Infect Dis**, (6):590-4, Dec 2010.

WEISSENBERGER, C. A., CAZALET, C., BUCHRIESER, C. *Legionella pneumophila* – a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 4, p. 432-48. Feb 2007. ISSN 1420-682X

WINCK, M. A.; CAUMO, K.; ROTT, M. B. Prevalence of *Acanthamoeba* from tap water in rio grande do Sul, Brazil. **Curr Microbiol**, v. 63, n. 5, p. 464-9, Nov 2011.

WINIECKA-KRUSNELL, J., LINDER, E. Free-living amoebae protecting *Legionella* in water: the tip of an iceberg. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 31, n. 4, p. 383-5. 1999.

WINN, W. C. Jr. Legionnaires Disease: Historical Perspective. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 1, n. 1, p. 60-81. Jan 1988. ISSN 0893-8512.

YODER J.S.; VERANI J.; HEIDMAN N.; HOPPE-BAUER J.; ALFONSO E.C.; MILLER D.; JONES D.B.; BRUCKNER D.; LANGSTON R.; JENG B.H.; JOSLIN C.E.; TU E.; COLBY K.; VETTER E.; RITTERBAND D.; MATHERS W.; KOWALSKI R.P.; ACHARY N.R.; LIMAYE A.P.; LEITER C.; ROY S.; LORICK S.; ROBERTS J.; BEACH M.J. *Acanthamoeba* keratitis: the persistence of cases following a multistate outbreak. **Ophthalmic Epidemiol**, v. 4, n. 19, p. 221-225, Aug 2012.