

MARCOS ANTONIO DE SOUZA CROZETTA

**IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE AMEBAS DE VIDA
LIVRE DO GÊNERO *Acanthamoeba* ISOLADAS EM POEIRA DE AMBIENTE
HOSPITALAR.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, dos Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração: Parasitologia.

Orientadora: Dr^a. Edilene Alcântara de Castro

Co-orientadora: Dr^a. Adriana Oliveira Costa

CURITIBA

2007

DEDICATÓRIA

À minha mãe que com tanto carinho ajudou no meu caráter e força de vontade, ao meu pai que com as suas limitações me deixou um legado de leitura e me ensinou a ser uma pessoa do bem, e também as minhas irmãs que deixaram muitas vezes de si para que eu pudesse ter os livros e materiais necessários para a minha formação estudantil. E especialmente a minha esposa Karine e aos meus filhos Marcos Vinícius e Leonardo que souberam entender e me apoiar nesse momento especial da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Paraná, e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, dos Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde, por terem me dado a oportunidade de realizar a pesquisa aqui referida.

A professora Dr^a. Edilene Alcântara de Castro por ter me aceito como seu orientado e pelo apoio prestado durante toda a realização deste trabalho.

A professora Dr^a. Adriana Costa que me ajudou em tudo, não só na orientação da pesquisa, mas me mostrou com humildade e competência e muita dedicação que tudo é possível. Que não me deixou desistir em momentos difíceis que se passaram na minha vida pessoal, mesmo quando eu não acreditava mais ela ainda assim acreditou em mim.

A toda equipe do laboratório de Parasitologia Veterinária e Biologia Molecular do Departamento de Patologia Básica, as minhas colegas Juliana Tracz Pereira, Helen Mariane Silva e Samira Chahad pelo incentivo nos corredores e pela ajuda no inglês, e a todos que de alguma maneira participaram desse projeto. Agradeço especialmente a professora Dr^a Vanete Thomaz Soccol por ter me cedido o espaço no laboratório e pelas suas advertências sempre oportunas.

Ao Hospital de Clínicas da UFPR, por ter permitido a realização das coletas de material.

A Dra. Cinthia Furst Leroy Gomes, da Universidade Federal do Espírito Santo, e a Profa. Dra. Annette Silva Foronda, (FMU-SP), que gentilmente nos cederam amostra de *Acanthamoeba* e de *Naegleria* sp. respectivamente.

A todos os que de uma maneira ou de outra, seja pelas aulas durante o curso ou apenas por um gesto de incentivo, contribuíram para a realização desse trabalho.

Meu

MUITO OBRIGADO.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	ii
AGRADECIMENTOS	iii
SUMÁRIO	iv
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Histórico	3
2.2. Classificação e identificação de AVL	4
2.2.1. Classificação	4
2.2.2. Identificação Morfológica de AVL	5
2.2.3. Identificação Molecular de AVL	8
2.3. Isolamento de Amebas de Vida Livre no Brasil	10
2.4. Infecções por Amebas de Vida Livre	11
2.4.1. Encefalite amebiana granulomatosa (EAG)	11

2.4.2. Acantamebíase Cutânea	12
2.4.3. Ceratite Amebiana	13
2.4.4. Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP)	14
2.5. Interações entre amebas do gênero <i>Acanthamoeba</i> e microorganismos endomutualistas (endossimbiontes)	15
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo Geral	16
3.2. Objetivos específicos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1. Coleta e Isolamento de AVL	16
4.2. Identificação Morfológica de AVL Encontradas nos isolados	18
4.3. Clonagem de trofozoítos cultivados em Agar-soja	18
4.4. Obtenção de culturas axênicas	19
4.4.1. Meio para cultivo axênico	19
4.4.2. Procedimento de axênização	19
4.4.3. Indução de encistamento	19
4.5. Clonagem em cultivo axênico	20
5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS AMOSTRAS DE AVL	21
5.1. Extração de DNA	21
5.2. Reação em cadeia da polimerase – PCR	22
5.3. Distinção de populações por Polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição	23
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
6.1. Isolamento de AVL em ambiente hospitalar	23
6.2. Identificação Morfológica dos Isolados de AVL	24

6.3. Clonagem de trofozoítos de AVL em cultivo com bactérias	27
6.4. Axenização de AVL	29
6.5. Clonagem em cultivo axênico	30
6.6. Identificação de <i>Acanthamoeba</i> por PCR	32
6.6.1. Extração de DNA	32
6.6.2. PCR e RFLP	32
7. CONCLUSÃO	37
8. PERSPECTIVAS	38
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	39
10. ANEXOS	44

LISTA DE TABELAS

Tabela	pág
Tabela 1 (Índice de positividade das observações microscópicas, clonagens e axenização dos isolados de AVL nos meses de novembro de 2006 e fevereiro de 2007).....	20
Tabela 2 (Índice de positividade das clonagens da amostra OFT, usando volumes de 5 e 1,5 µL de suspensão com 200 Trofozoítos/mL).....	28
Tabela 3 (Índice de positividade na clonagem em Agar semi-sólido, usando a cultura OFT ax.).....	31

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Classificação dos principais gêneros de amebas de vida livre.	4
Figura 2	Esquema de um trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> , mostrando a presença de acantopódios.	5
Figura 3	Esquema de cistos de <i>Acanthamoeba</i> , mostrando a parede cística dupla, ectocisto e endocisto.	5
Figura 4	<i>Acanthamoeba</i> sp. encontrada em poeira de diferentes ambientes do Hospital de Clínica da UFPR.	25
Figura 5	Morfologia de cistos encontrados nas amostras OFT (1 e 2), UTI (1 e 2) e ENF (1).	26
Figura 6	Clonagem de trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> cultivados em Agar soja. ..	28
Figura 7	Morfologia de cistos encontrados nos clones OFT cIA3, OFT cIB3 e OFT cIC3.	29
Figura 8	Trofozoítos e cistos de <i>Acanthamoeba</i> em cultivo axênico.	30
Figura 9	Placa de meio PYG com Agar a 0,7%.	31
Figura 10	Eletroforese em gel de agarose 0,8% com amostras de DNA de <i>Acanthamoeba</i>	32
Figura 11	Produtos de amplificação do fragmento do rDNA 18S usando DNA de isolados <i>Acanthamoeba</i>	33
Figura 12	Produtos de amplificação do fragmento do rDNA 18S usando DNA de <i>Acanthamoeba</i>	34
Figura 13	Esquema dos perfis de amplificação do fragmento gênico do rDNA 18S e da morfologia dos cistos em amostras de <i>Acanthamoeba</i> obtidas de poeira do Hospital de Clínicas da UFPR.	35
Figura 14	Esquema dos perfis de amplificação do fragmento gênico do rDNA 18S em amostras de <i>Acanthamoeba</i> obtidas de poeira do Hospital de Clínicas da UFPR.	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVL = Amebas de Vida Livre

EAG = Encefalite Amebiana Granulomatosa

CA = Ceratite por *Acanthamoeba*

MAP = Meningoencefalite Amebiana Primária

SNC = Sistema Nervoso Central

HC = Hospital de Clínicas

UFPR = Universidade Federal do Paraná

UTI = Unidade de Tratamento Intensivo

px = Cultivo polixênico

ax = Cultivo axênico

CG = Setor de Cirurgia Geral

COR = Corredor

ENF = Setor de Enfermaria

OFT = Setor de Oftalmologia

EDTA = Etileno Diamino Tetra Acético

NaCl = Cloreto de Sódio

SDS = Dodecil Sulfato de Sódio

PCR = Reação em Cadeia de Polimerase

FMU = Faculdades Metropolitanas Unidas de São Paulo

MgCl₂ = Cloreto de Magnésio

DNTP = Didesoxinucleotídeo

RFLP = Polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição

BSA = albumina sérica bovina

WAL = Isolado de Córnea com Ceratite

RESUMO

Espécies do gênero *Acanthamoeba*, *Naegleria* e *Balamuthia* pertencem a um grupo de amebas classificadas como Amebas de Vida Livre potencialmente patogênicas. São encontradas nos mais variados ambientes como solo, água, ar e como parasitas de vários animais e do homem. No homem causam infecções do sistema nervoso central, lesões de córnea e cutânea, principalmente em indivíduos com o sistema imunológico debilitado como é comum em ambientes hospitalares. O objetivo deste trabalho foi de isolar e identificar morfológicamente e por técnicas de biologia molecular, amebas de vida livre, potencialmente patogênicas, em amostras de poeira de diferentes ambientes do Hospital de Clínicas de Curitiba. Trinta amostras foram coletadas no período de novembro de 2005 a fevereiro de 2006, semeadas em meio Agar soja com bactérias (cultivo polixênico) e todas elas foram positivas para a presença de amebas de vida livre. As amostras foram axenizadas e clonadas para a extração do seu DNA e submetidas à técnica de PCR. Os resultados da identificação morfológica e de biologia molecular confirmaram a presença de amebas do gênero *Acanthamoeba*. Este é o primeiro trabalho de isolamento de amebas de vida livre no ambiente realizado no Estado do Paraná. É importante chamar a atenção das autoridades de saúde para possíveis casos de infecções por AVL, cuja demora no diagnóstico leva a tratamentos ineficazes que podem agravar o quadro do paciente.

Palavras-chave: *Acanthamoeba*; isolamento; DNA/PCR; poeira hospitalar.

ABSTRACT

Acanthamoeba, *Naegleria* and *Balamuthia* are genera included in the group of potentially pathogenic Free-Living Amebas. They are found in different environments such as ground, water, air and as parasites of several animals and man. In humans, they cause infections in the central nervous system, cornea and cutaneous injuries, mainly in those individuals with a weak immunological system, a very common condition in hospital environment. The aim of this research was, to isolate and morphologically identify free life amebas which are potentially pathogenic found in dust samples of different location of the Curitiba Clinical Hospital, buy using molecular biology techniques. Thirty samples were isolated in the period of November 2005 and February 2006, were sowed in soy agar medium with bacteria (polixenic culture), and all of them were positive for the presence of Free-Living Amebas. The samples were axenized and cloned in order to extract their DNA and after words, to perform PCR technique. The morphological and molecular biology results confirmed the presence of amebas of genus *Acanthamoeba*. This is the first research of free-living amoebae isolation from environment carried out in Paraná State. It is important to call attention to health authorities for possible cases of infection, which late diagnosis leads to inefficient treatments that may get the patient conditions worse.

Key words: *Acanthamoeba*; isolation; DNA/PCR; hospital dust.

1. INTRODUÇÃO

As amebas do gênero *Acanthamoeba*, juntamente com os gêneros *Naegleria*, *Balamuthia* e *Sappinia*, são organismos que fazem parte de um grupo denominado amebas de vida livre (AVL). São protozoários aeróbios encontrados nos mais variados ambientes e em todos os continentes, independentemente do clima ou de qualquer outro fator ambiental. Estão presentes no ar, lagos e lagoas, em cavas para a extração de areia ou argila, são encontradas também no solo, no seu estado natural, ou quando adubado (solo húmifero), na poeira doméstica e de logradouros públicos e hospitalares, em rios, piscinas, esgotos, águas de torneiras, mares e oceanos. Resistem a extremas condições de temperatura e pH, ao cloro, e a outros produtos de desinfecção. São encontradas em peixes, répteis, pássaros e mamíferos, como parte da microbiota normal destes animais. No ser humano, já foram detectadas na cavidade nasal, pele, olhos e no sistema digestório, sem causar doenças (FORONDA, 1979; GIAZZI, 1996; SILVA e ROSA, 2003; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003).

As AVL são organismos considerados potencialmente patogênicos, pois em condições de anormalidade como mudanças de pH, presença de lesões ou o que parece ser mais comum, a queda do sistema imune, podem atuar como parasitas, causando cegueira, morte ou incapacidade permanente (MARTINEZ e JANITSCHKE, 1985; GIAZZI, 1996; SUAREZ, et al, 2000; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). A espécie *Naegleria fowleri* é causadora de meningoencefalite amebiana primária, infecção incomum de curso geralmente fatal. *Balamuthia mandrillaris* e *Sappinia diploidea* foram descritas em casos de encefalite granulomatosa (GELMAN, et al 2001).

Quanto ao gênero *Acanthamoeba*, são descritas atualmente 24 espécies, (STOTHARD, 1998; QUARNSTROM, 2006; NCBI taxonomy database, 2007). Algumas dessas espécies estão associadas a infecções cutâneas e do sistema nervoso central geralmente em indivíduos imunodeprimidos. As mais freqüentemente associadas a estas patologias segundo WALOCHNIK et al, 2000 são: *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. rhyssodes* e *A. divionensi*. A importância crescente de *Acanthamoeba* se deve também aos relatos de ceratite causada pelo protozoário. A popularização do uso de lentes de contato, associada a hábitos que propiciam a contaminação das soluções para sua limpeza e

estocagem, são os fatores determinantes da ocorrência dessa infecção (WALOCHNIK, et al, 2000; OBEID, et al, 2003; RUTHES, et al, 2004).

A partir de 1970, o número de casos assinalados de infecções por amebas de vida livre (AVL) no mundo vem crescendo (ALVES, 2001). Os motivos deste crescimento podem ser o aumento da resistência desses organismos aos produtos de desinfecção e aos medicamentos usados no seu tratamento, como a anfotericina B, clotrimazol, itraconazole, pentamidine, 5-fluocitosine, o gluconato de clorexidine tópico e o cetoconazol creme (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003), que só se mostram eficazes quando administrados precocemente (MARTINEZ, 1993). Nenhuma única droga ainda se mostrou efetiva contra trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba* (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). O tratamento bem sucedido das infecções por AVL depende de fatores como diagnóstico precoce, da espécie e tipo de infecção e em vários casos só é possível quando associadas diferentes drogas.

A diminuição da resistência do hospedeiro, o maior conhecimento destes organismos pelas autoridades de saúde pública ou, ainda, pela preocupação em se determinar a causa morte de casos que, muitas vezes, eram indeterminados são outros motivos para o aumento do número de casos de infecções por AVL.

No Brasil, apesar de já terem sido descritos casos de doenças em seres humanos, poucos são os relatos da presença de AVL no ambiente e não há estudos identificando o potencial patogênico destes isolados. Em ambiente hospitalar, um único relato no Brasil, segundo a bibliografia consultada até o presente, mostrou uma prevalência de 45,5% de positividade para o gênero *Acanthamoeba* e de 3,8% para amebas do gênero *Naegleria* (SILVA E ROSA, 2003). Considerando que alguns desses organismos podem causar infecções fatais, principalmente em indivíduos debilitados e imunodeprimidos, e também podem carrear outros agentes patogênicos (bactérias, fungos e vírus) em seu interior, a sua ocorrência em ambientes hospitalares pode representar um risco para estes pacientes (JONCKHEERE, 1991, SCHUSTER, 2002; SILVA e ROSA, 2003; KILVINGTON e PRICE, 1990). É importante salientar que uma grande parte dos profissionais de saúde não está familiarizada com estas possíveis infecções e o diagnóstico precoce é fundamental para se obter um prognóstico favorável nos casos de infecções por AVL.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico

O interesse médico e epidemiológico a respeito das AVL começou em 1958 quando CULBERTSON et al, durante a produção de vacinas para a poliomielite, observaram o desenvolvimento de placas de algum organismo contaminante da cultura celular. O fluído dessas placas contaminadas quando inoculado em ratos e macacos levava-os à morte por encefalite. Nessas culturas foram posteriormente isolados trofozoítos e cistos de amebas pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* (FORONDA, 1979; REY, 1991; SILVA, 2001; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). Após este relato, logo outros casos de encefalite amebiana foram diagnosticados em outros países tendo como agente causal *Naegleria fowleri*.

Em 1974, NAGINGTON et al, descreveram no Reino Unido dois casos de ceratoconjuntivite em pacientes com infecção ocular moderada tido como uveíte que não responderam ao tratamento. Meses depois, foram isoladas amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* nas lesões oculares. Em 1975, JONES, et al, descreveram um caso de ceratite provocada por *A. polyphaga*, com posterior comprometimento do sistema nervoso central. RINGSTED, et al (1976) descreveram um caso de uma criança coreana de 5 anos de idade com granulomas epiteliais e morte por meningoencefalite provavelmente causada por ameba do gênero *Acanthamoeba*. Em 1977, MARTINEZ, et al, relacionam a provável porta de entrada das AVL no organismo humano via olfativa e associam a infecção a indivíduos imunologicamente debilitados ou que tenham recentemente história de nadar em lagos ou piscinas aquecidas. GULLETT, et al (1979) descreveram um caso de encefalite amebiana granulomatosa disseminada a partir de uma lesão de pele causada por *A. astronyxis*.

No Brasil, os primeiros relatos de infecção por AVL foram devido a *Naegleria*. FORONDA, em 1971, isolou do líquido cefalorraquidiano de um paciente com um quadro de meningoencefalite, organismos com características de amebas do gênero *Naegleria* (SILVA, 2001). CAMPOS et al (1977), na cidade de São Paulo, e BIASOLI et al (1981), em Fortaleza, encontraram em liquor de pacientes com meningoencefalite formas trofozoíticas de AVL. O primeiro caso confirmado de meningoencefalite por AVL foi descrito por CARVALHO et al (1983), após necropsia do tecido cerebral de uma jovem que falecera em 1972 de meningoencefalite de causa não esclarecida. O agente etiológico foi identificado como *Naegleria fowleri* (SILVA, 2001). No Brasil, NOSÉ et al, em 1988

descreveram os primeiros casos de ceratite em humanos provocadas por AVL do gênero *Acanthamoeba*.

2.2. Classificação e identificação de AVL

2.2.1 Classificação

A classificação das amebas de vida livre, inclusive as potencialmente patogênicas em nível genérico foi estabelecida pelos trabalhos de PAGE (1967). Os dois primeiros gêneros incluídos na família Vahlkampfiidae descritos para AVL foram *Naegleria* (ALEXEIEFF, 1912), e *Acanthamoeba* descrito por CASTELLANI e estabelecido por VOLKONSKY, em 1931 (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). Este último foi posteriormente incorporado a família Acanthamoebidae (HO-JOON e KYUNG, 2004).

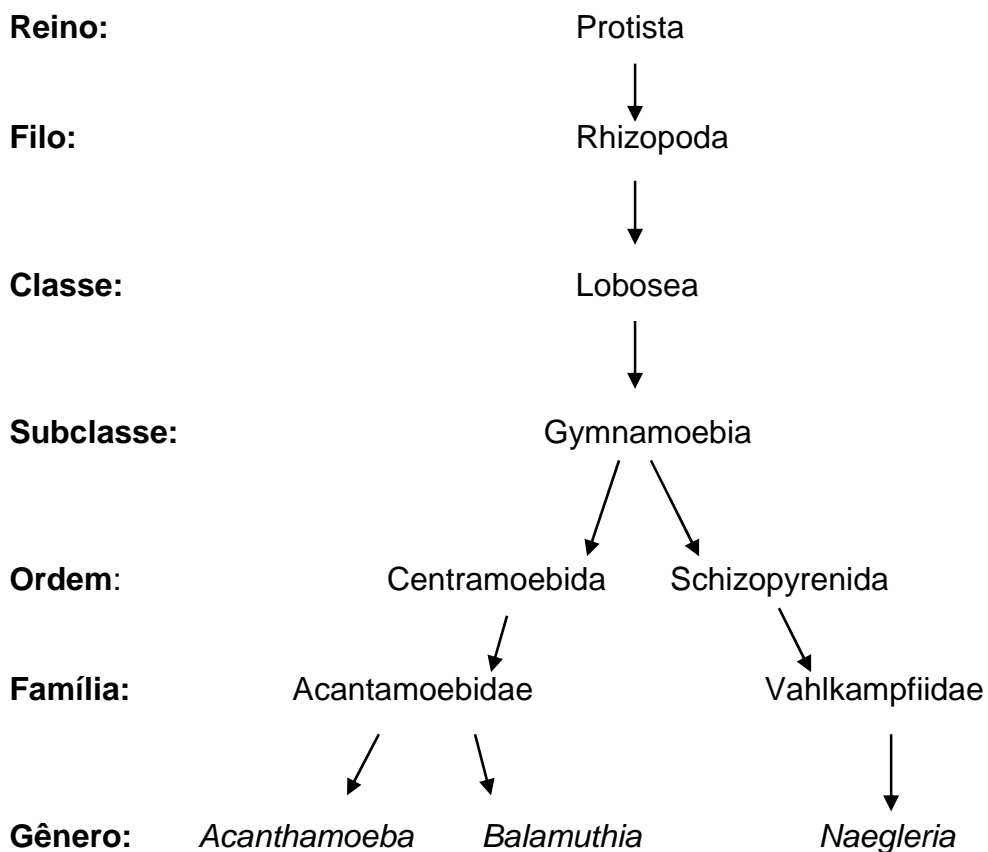
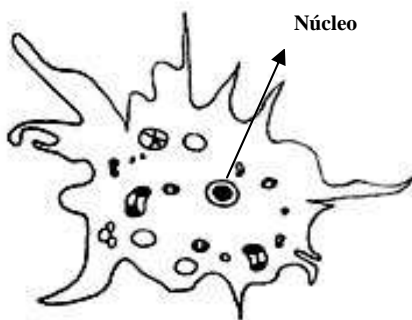


Figura 1 - Classificação dos principais gêneros de amebas de vida livre (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003).

2.2.2. Identificação Morfológica de AVL

Gênero *Acanthamoeba*

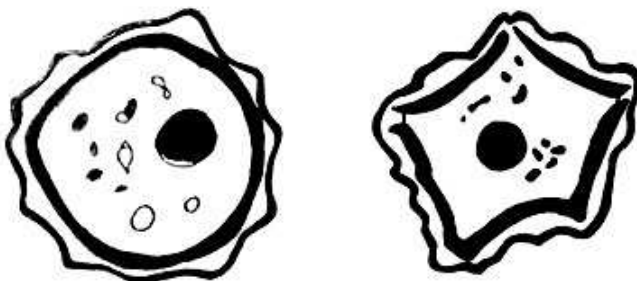
As espécies do gênero *Acanthamoeba* apresentam no seu ciclo de vida uma fase trofozoítica, ativa, que se alimenta e se reproduz, e uma forma cística observada quando as condições são desfavoráveis, como a falta de nutrientes, alterações de pH ou de temperatura e dessecação. O trofozoíto de *Acanthamoeba* apresenta um tamanho variando entre 20 μm a 40 μm . Possui um núcleo único com um grande cariossoma central rodeado por um halo claro. O citoplasma do trofozoíto de *Acanthamoeba* é abundante e apresenta-se granuloso com movimentos polidirecionais através da emissão de pseudópodos globosos e hialinos, de onde surgem numerosas projeções filiformes conhecidas como acantopódios (**Figura 2**). É evidente também a presença de vacúolos pulsáteis contraindo-se e ajudando na regulação osmótica.



20 - 40 μm

Figura 2. Esquema de um trofozoíto de *Acanthamoeba*, mostrando a presença de acantopódios (ODDÓ, 2006).

Os cistos do gênero *Acanthamoeba* apresentam diâmetro variando entre 15 μm a 25 μm e são uninucleados. São facilmente caracterizados pela parede dupla provida de poros chamados ostíolos (**Figura 3**).



15 - 25 μm

Figura 3. Esquema de cistos de *Acanthamoeba*, mostrando a parede cística dupla, ectocisto e endocisto (ODDÓ, 2006).

A parede externa ou ectocisto é mais ou menos ondulada e a mais interna ou endocisto pode apresentar-se poligonal, esférica ou estrelada. Os dois envoltórios são separados entre si, mas se unem nos ostíolos (PAGE, 1967; GIAZZI, 1996; SILVA, 2001). Os cistos são resistentes a detergentes, cloro e antibióticos, porém são destruídos pela autoclavagem ou com tratamento por Freon ou óxido de metileno (JONCKHEERE e VAN DE VOORDE, 1976; TURNER, et al, 2000; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003).

Em 1977, PUSSARD e PONS propuseram a divisão do gênero *Acanthamoeba* em três grupos morfológicos com 18 espécies, e que atualmente abrigam 24 espécies diferentes, baseados no tamanho e na forma dos cistos:

Grupo I - Espécies *A. astronyxis*, *A. commandoni*, *A. echinulata*, *A. pearcei* e *A. tubiashi* (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). Estas espécies são caracterizadas por apresentarem cistos grandes, em relação às do grupo II e III, aproximadamente 20 µm de diâmetro ou mais. Os cistos se caracterizam pela forma estrelada da parede cística interna ou endocisto e a parede externa do cisto ou ectocisto é mais ou menos esféricas (PUSSARD e PONS, 1977; SILVA, 2001; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). Estas espécies não são consideradas patogênicas, porém já foi detectado um caso de infecção granulomatosa cerebral por *Acanthamoeba astronyxis* por FERNANDEZ e CRESPO, em 1992 (SILVA, 2001).

Grupo II - Espécies *A. castellanii*, *A. divionensis*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. lugdunensis*, *A. mauritaniensis*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhysodes*, *A. stevensoni* e *A. triangularis* (WALOCHNIK, 2000; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). Seus cistos possuem um tamanho médio com diâmetro inferior a 18 µm, o endocisto pode apresentar-se de forma estrelada, oval, triangular ou quadrangular e o ectocisto segue mais ou menos o contorno do endocisto (WALOCHNIK, 2000; SCHUSTER, 2002). Estão enquadradas neste grupo as espécies mais freqüentemente isoladas de casos de meningoencefalites e ceratites, segundo FERNANDEZ E CRESPO, 1992 apud SILVA, 2001.

Grupo III - Espécies *A. culbertsoni*, *A. healyi*, *A. jacobsi*, *A. lenticulata*, *A. palestinensis*, *A. postulosa* e *A. royreba* (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). Compreende as espécies de tamanho médio que medem aproximadamente 18

µm de diâmetro, com endocisto de forma oval ou globosa, nunca estrelado. O ectocisto delgado e liso justaposto ao endocisto é, às vezes, difícil de ser observado (PUSSARD e PONS, 1977; SILVA, 2001; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003).

Gênero *Naegleria*

Os trofozoítos das espécies do gênero *Naegleria* apresentam a forma cilíndrica, emitem um pseudópodo único, hialino e de forma variada. Quando se encontram em um meio onde podem mover-se de forma rápida, emitem um pseudópodo bidirecional, assumindo a forma característica de um "Y". O tamanho do trofozoíto varia de 10 a 30 µm. Possui um núcleo redondo com um grande cariossoma central rodeado por um halo claro; excepcionalmente podem possuir dois, três e até quatro núcleos. No citoplasma, podem ser observados vários vacúolos digestivos formados no momento de realizar a fagocitose, assim como vacúolos pulsáteis na periferia da célula com função de osmorregulação (HO-JOON e KYUNG, 2004; SILVA, 2001).

Uma característica particular do gênero *Naegleria* é a existência, em seu ciclo, de uma forma flagelada que, em condições experimentais, se consegue por hipotonização do meio (PAGE, 1967). Esta forma possui aspecto piriforme, sem citóstoma e possui dois flagelos, excepcionalmente, três ou quatro. Essa forma é temporária e transitória (SILVA, 2001; HO-JOON e KYUNG, 2004).

Os cistos apresentam forma circular ou, ligeiramente, poligonais, são uninucleados, lisos e providos de poros que, em algumas espécies, não podem ser observados por microscopia ótica, mas cuja existência foi constatada para a maioria das espécies por microscopia eletrônica. O tamanho varia de 10 a 17 µm (HO-JOON e KYUNG, 2004).

Nas espécies do gênero *Naegleria* as diferenças morfológicas são muito pequenas e por isso, têm sido propostos vários critérios biológicos para facilitar a diferenciação entre elas. Alguns critérios que podem ser utilizados na diferenciação das espécies desse gênero são: capacidade de crescimento em meio axênico SCGYEM (meio composto por soro, caseína, glicose e extrato de levedura) temperatura ótima de crescimento, patogenicidade experimental em camundongos, efeito citopatogênico sobre cultura de células e aglutinação com concanavalina (FEMANDEZ E CRESPO, 1992 apud SILVA, 2001).

Na literatura, são descritas trinta e uma espécies de amebas pertencentes

ao gênero *Naegleria* (NCBI taxonomy database, 2007). Embora *Naegleria australiensis*, *N. italica* e *N. philippinensis* sejam patogênicas para camundongos até o momento o que se conhece é que apenas *Naegleria fowleri* pode causar doença em seres humanos.

Gênero *Balamuthia*

Os trofozoítos de *Balamuthia* são os maiores entre os gêneros de amebas causadoras de doenças em humanos e medem entre 12 e 60 μm . Apresentam forma irregular com pseudópodos ramificados. Os cistos medem entre 6 e 30 μm , a sua parede é densa revestida por 3 envoltórios e não apresenta poros. Até pouco tempo haviam sido isolados apenas em infecções, mas recentemente na Califórnia (E.U.A.), foi recuperada na terra de um vaso da casa de uma criança que morreu de meningoencefalite, cistos de *B. mandrillaris* (DUNNEBACKE, 2004).

Gênero *Sappinia*

Apresenta na forma de trofozoíto um citoplasma hialino, apresenta uma superfície dorsal lisa, às vezes com algumas rugas laterais minúsculas, dois núcleos arredondados de 3,8 a 4,6 μm de diâmetro presos um ao outro por filamentos perpendiculares cada núcleo apresenta um nucléolo vesicular de aproximadamente 2,3 μm de diâmetro (GELMAN, 2003). Os cistos apresentam parede dupla e são arredondados, com aproximadamente 30 a 34 μm de diâmetro.

2.2.3. Identificação Molecular das AVL

As técnicas moleculares para identificação de AVL têm sido desenvolvidas não somente para auxiliar o diagnóstico de infecções humanas, mas também para identificação de AVL em amostras ambientais, (KILVINGTON e BEECHING, 1995; LEHMANN et al, 1998; MARCIANO-CABRAL et al, 2003; JONCKHEREE, 2007). Estes métodos consistem em análise de DNA, variação por RFLPs e PCR da subunidade 18S de rRNA, sucessões nucleares parciais, variação em rRNA mitocondrial (MARCIANO-CABRAL e CABRAL 2003). No gênero *Acanthamoeba*, em que várias espécies são encontradas, os estudos buscam o estabelecimento de relações filogenéticas entre elas (GAST et al, 1996; STOTHARD, et al, 1998) .

GAST et al, 1996, através da análise do DNA ribossomal da subunidade 18s, estabeleceu um novo critério de identificação para *Acanthamoeba*, os autores utilizaram a seqüência do gene que codifica o RNA da subunidade menor do ribossomo, organizando o gênero em doze grupos de T1 a T12. As amebas do grupo I encontram-se nas seções T7, T8 e T9. As do grupo II incluem as seções T3, T4, e T11 e as do grupo III nas seções T1, T2, T5, T6, T10 e T12. Estudos de isolados causadores de ceratite são pertencentes à seção do tipo T4, do grupo II, *A. castellanii*, *A. lugdunensis*, *A. mauritaniensis*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhysodes* e *A. triangularis* (GAST et al, 1996; WALOCHNIK, 2000).

Genes ribossômicos de *Acanthamoeba* são os que vêm apresentando resultados mais promissores para a caracterização molecular em nível de gênero e específica deste grupo (ALVES, 2001), o tamanho (cerca de 2.000 pares de bases no SSU rDNA), a grande quantidade de cópias no genoma, a ubiquidade, a grande quantidade de dados que já foram gerados sobre essas seqüências em diversos grupos de organismos, facilita a análise comparativa (ALVES, 2001).

Através da técnica de PCR para a identificação de *Acanthamoeba*, LEHMANN et al, 1998 relataram que esta técnica pode ser útil para identificar AVL do gênero *Acanthamoeba* em lágrima de pacientes suspeitos de infecções na córnea mesmo com um número pequeno de exemplares (de uma a cinco amebas). Este ensaio de PCR de lágrimas pode servir como uma ferramenta diagnóstica ou também pode ser usado para monitorar a resposta ao tratamento.

Quanto a identificação de AVL em amostras ambientais, a PCR foi utilizada para detecção de *Naegleria fowleri* em fontes de água (KILVINGTON e BEECHING, 1995; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). Amostras ambientais também são pesquisadas quanto a presença de *Acanthamoeba*, por técnicas de PCR visando a identificação em nível de gênero e espécie-específica (LORENZO-MORALES et al, 2005; LORENZO-MORALES et al, 2006).

2.3. Isolamento de Amebas de Vida Livre no Brasil

Um número considerável de trabalhos relatando o encontro de AVLs em amostras ambientais podem ser encontrados na literatura e ainda nos últimos anos a preocupação em monitorar a presença destes organismos no ambiente pode ser confirmada pelas publicações em várias partes do mundo (TSVETKOVA et al, 2004; LORENZO-MORALES et al. 2005a,b, 2006; De JONCKHEERE, 2006;).

No Brasil, os primeiros isolados de amebas do ambiente foram feitos por FORONDA, em 1979, isolando AVL em água de um açude, da água da rede de distribuição pública e do lodo de piscinas em São Paulo. MOURA, em 1980, isolou diversos gêneros de amebas de vida livre a partir de piscinas de clubes da cidade do Rio de Janeiro. CHAVES et al (1985), num estudo realizado entre 1981 e 1982, encontraram espécies de *Acanthamoeba* e *Naegleria*, além de outras amebas de vida livre em águas de piscinas na cidade de Campo Grande, no Mato Grosso do Sul.

SALAZAR et al, em 1982, isolaram amebas de vida livre a partir de águas minerais engarrafadas comercializadas na cidade do Rio de Janeiro. Em 90% das amostras estudadas foram isoladas espécies de amebas de vida livre, sendo que 60% foram positivas para amebas do gênero *Acanthamoeba*. GIAZZI, em 1996, estudando a prevalência de amebas de vida livre coletou 23 amostras de poeira de vários ambientes na cidade de Araraquara – SP, e obteve um percentual de 86,9% para espécies de *Acanthamoeba* e de 39,1% para espécies de *Naegleria*. Quando foram consideradas apenas as amostras de poeira coletadas em ambientes fechados, o autor obteve índices de positividade de 87,5% e 50% para espécies de *Acanthamoeba* e *Naegleria*, respectivamente.

Em ambiente hospitalar, um único relato de isolamento de AVL é descrito, realizado por SILVA e ROSA (2003). Os autores coletaram cento e trinta e duas amostras de poeira em dois hospitais de São Paulo, e o índice de positividade para AVL foi de 45,5% para amebas do gênero *Acanthamoeba* e de 3,8% para amebas do gênero *Naegleria*.

2.4. Infecções por Amebas de Vida Livre

As doenças causadas por AVL, no ser humano, são a encefalite amebiana granulomatosa (EAG), a acantamebíase cutânea, a ceratite amebiana ou ceratite por *Acanthamoeba* (CA) e a meningoencefalite amebiana primária (MAP). As três primeiras são infecções de curso crônico e evolução geralmente prolongada. O período de incubação é ainda desconhecido, mas são necessários semanas ou meses para se estabelecer o período clínico da doença (JONCKHEERE, 1991; MARCIANO-CABRAL E CABRAL, 2003). Esta é a principal diferença da meningoencefalite amebiana primária, caracterizada por lesões necrotizantes e hemorrágicas do sistema nervoso central com uma evolução clínica rápida e fatal em aproximadamente sete dias.

2.4.1. Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG)

A encefalite amebiana granulomatosa é uma doença de curso clínico prolongado, com um quadro subagudo ou crônico, provocada por várias espécies de amebas do gênero *Acanthamoeba*, por uma espécie do gênero *Balamuthia*, *B. mandrillaris* e por uma espécie do gênero *Sapinia*, *S. diploidea* (MARTINEZ et al, 1994; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003).

A EAG provocada por espécies de *Acanthamoeba* está geralmente associada a outras doenças debilitantes como a diabetes, lupus eritematoso sistêmico, insuficiência renal, cirrose, tuberculose, úlceras de pele, doença de Hodgkin e infecção por HIV (VIVESVARA et al, 1990; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). As espécies mais freqüentes nos casos de EAG são: *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. rhyodes* e *A. divionensi* (WALOCHNIK et al, 2000; SILVA e ROSA, 2003). Outros fatores que predispõem ao aparecimento de EAG incluem o alcoolismo, o uso de drogas, tratamentos com esteróides, quimioterapia, radioterapia e transplantes de órgãos (SELL et al, 1997; CABRAL e CABRAL, 2003). Porém, casos de EAG já foram observados em indivíduos sem nenhuma debilitação orgânica MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). A porta de entrada pode ser o trato respiratório, úlceras da pele ou qualquer ferida aberta na superfície mucosa ou serosa do corpo, inclusive através de cateteres de diálise peritoneal (MARTINEZ et al, 1980; VIVESVARA et al, 1990). A via de invasão e penetração no sistema nervoso central parece ser a hematogênica, a partir do foco primário de entrada da ameba e também através

do epitélio neuro-olfatório (MARTINEZ et al, 1994). O período de incubação não é bem conhecido, podendo ser de semanas ou meses. Alguns pacientes apresentam nódulos na pele poucos dias antes do aparecimento dos sintomas e sinais neurológicos. Estes nódulos podem ser devidos à disseminação da infecção amebiana (CRUZ e CHACÓN, 1989; SISON et al, 1995 *apud* SILVA, 2001). Outros pacientes apresentam, inicialmente, sintomas de infecção respiratória ou gastrointestinal (MARTINEZ e JANITSCHKE, 1985). Os principais sintomas são: desordens no estado mental, cefaléia intensa, febre não muito elevada, rigidez da nuca, náuseas e vômitos, ataques apopléticos, e um nível diminuído de consciência. Em alguns casos, a doença evolui para o coma antes do óbito (MARTINEZ et al, 1994). Mais de 240 infecções de encefalite amebiana granulomatosa (EAG) foram informadas na literatura a partir de 2002, a maioria deles com resultados fatais (QUARNSTRON, 2006).

2.4.2. Acantamebíase Cutânea

A acantamebíase cutânea ou dermatite acantamebiana é uma infecção oportunista da pele, produzida por protozoários do gênero *Acanthamoeba*, muito comum em pacientes com AIDS e em pacientes com outras debilidades imunológicas ou não, com ou sem envolvimento do sistema nervoso central (SNC) (ODDÓ, 2006; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). A forma cutânea da doença é caracterizada pela presença de nódulos eritematosos duros ou úlceras de pele. O início das manifestações cutâneas incluem a presença de nódulos firmes que escoam material purulento e evoluem para formas ulcerosas. Se lesões de pele representam um foco primário de infecção ou são o resultado de disseminação hematogênica de outros locais como a área respiratória, seios olfatórios ou SNC não é conhecido (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). A taxa de mortalidade para pacientes sem envolvimento do SNC é de aproximadamente de 73%, enquanto que para aqueles que apresentam envolvimento do SNC é de 100% de mortalidade (TORNO et al, 2000, MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003).

O exame histológico de lesões cutâneas geralmente mostra focos de necrose cercados de células inflamatórias, vasculítes e presença de trofozoítos e cistos de amebas (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). Os parasitos podem ser escassos e difíceis de encontrar ou abundantes com numerosos cistos associados ao granuloma. O aspecto dos parasitos é semelhante ao encontrado

em lesões tissulares do sistema nervoso, entretanto podem confundir-se com outros agentes infecciosos ou mesmo com macrófagos quando o examinador não está familiarizado com AVL. O aparecimento de lesões de pele pode assemelhar-se a lesões por fungos, vírus, micobacteria, inflamação devido a um corpo estranho, leishmaniose, ou câncer de pele como sarcoma de Kaposi (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). Nos casos de comprometimento cutâneo por AVL, é importante a identificação precoce da natureza da lesão, pois muitas vezes esta evolui para comprometimento neurológico. Uma suspeita clínica e um diagnóstico de certeza levam a um tratamento precoce que pode modificar o prognóstico da doença.

2.4.3. Ceratite Amebiana

A ceratite por *Acanthamoeba* é uma infecção crônica da córnea. As lesões oculares ocorrem, provavelmente, a partir de um microtraumatismo do olho. A contaminação do olho pelas amebas pode ocorrer a partir da água contaminada ou de partículas do ar ou do solo que contenham amebas. Recentemente, tem sido descritos muitos casos de ceratite por espécies de *Acanthamoeba* entre usuários de lentes de contato, principalmente, entre aqueles que fizeram uso de solução salina feita em casa, os que nadaram usando lentes e os que não fizeram a desinfecção das mesmas no tempo recomendado pelos fabricantes (STEHR-GREEN, BAILEY e VISVESVARA, 1989; OBEID et al, 2003; CARVALHO, 2004).

Outros segmentos oculares também podem ser invadidos como a câmara anterior (McCLELLAN e COSTER, 1987). O olho apresenta uma zona circular externa hipervascularizada e uma infiltração da córnea. Pode aparecer, simultaneamente, uma uveíte com posterior ulceração supurativa, com zona necrótica e edema de estroma. O exame anatomopatológico da córnea revela a presença de um infiltrado de polimorfonucleares e uma zona hipervascularizada onde podem ser vistos cistos e trofozoítos de amebas. Os principais sintomas são sensação de corpo estranho no olho, irritação, inflamação, dor severa, tipicamente desproporcional aos sinais clínicos, edema da pálpebra com pequena secreção, fotofobia e visão alterada com perda gradual da mesma (VIVESVARA e STEHR-GREEN, 1990; FERNANDEZ e CRESPO, 1992; OBEID et al, 2003; RUTHES et al, 2004).

A infecção é de difícil diagnóstico e tratamento. Falhas no controle da infecção pode levar à permanente perda da visão. Sinais como um infiltrado em

anel no estroma corneal é sugestivo de ceratite por *Acanthamoeba* e uma ceratoneurite radial é considerada como patognomônico dessa infecção (WALOCHNIK et al, 2000, OBEID et al, 2003; RUTHES et al, 2004).

Devido à ênfase dada ao uso de lentes de contato como principal fator de risco para ceratite amebiana, o diagnóstico dos casos de infecção entre não usuários de lentes de contato tem sido retardado, levando a um pior resultado no tratamento. Neste caso, os principais fatores de risco são a exposição à água contaminada por amebas ou trauma (SILVA, 2001; OBEID et al, 2003; RUTHES et al, 2004). Em 2003, ALVARENGA e FREITAS relatam que o maior empecilho ao tratamento na fase epitelial é a demora no diagnóstico.

Durante esta fase, a infecção pode não ser diagnosticada, pois apresenta características inespecíficas como irregularidade epitelial, ceratite ponteadas e defeito epitelial. Além destes achados, uma forma semelhante à ceratite dendritiforme, leva frequentemente ao diagnóstico equivocado de ceratite herpética.

O número de casos de ceratite amebiana provocada por *Acanthamoeba*, diagnosticados aumentou dramaticamente durante os últimos vinte anos, calcula-se que mais de 3.000 casos aconteceram somente nos Estados Unidos (QUARNSTRON, 2006). A incidência anual de ceratite por *Acanthamoeba* foi estimada em 1,36 por milhão nos EUA (STHER-GREEN, BAILEY e VIVESVARA, 1989), em 3,06 por milhão na Holanda (MORLET et al, 1997) e em 1,2 por milhão no país de Gales (RADFORD et al, 2002). Na Inglaterra, a incidência é de 0,2 a 1 indivíduo para cada 10.000 usuários de lentes de contato por ano (RADFORD et al, 2002).

2.4.4. Meningoencefalite Amebiana Primária

A meningoencefalite amebiana primária é uma doença neurológica causada por uma única espécie do gênero *Naegleria*, *Naegleria fowleri* (CARTER, 1970). É caracterizada por lesões necrotizantes e hemorrágicas do sistema nervoso central com uma evolução clínica rápida e fatal. Essa doença foi diagnosticada em todos os continentes, sendo que o maior número de casos publicados ocorreu nos Estados Unidos e Austrália, com ocorrência predominante nos meses do verão. A porta de entrada pode ser a cavidade nasal por inalação de poeira ou aspiração de água contaminada. A via de invasão do sistema nervoso central é o epitélio neuro-otfativo. O período de incubação varia de dois

a três dias, podendo prolongar-se por sete a quinze dias, dependendo da quantidade de amebas inaladas ou aspiradas e da virulência do parasita. Os primeiros sintomas são: cefaléia intensa e repentina, anorexia, febre, náuseas e vômitos que precedem os sinais de irritação meníngea. Em alguns casos, foram observados faringite e obstrução nasal. Rapidamente, evolui com sinais mais raros de meningoencefalite como transtornos mentais, confusão, sonolência, delírio e coma (FERNANDEZ e CRESPO, 1992; MARTINEZ, 1993).

2.5. Interação entre *Acanthamoeba* e microorganismos endomutualistas (endossimbiontes).

Amebas do gênero *Acanthamoeba* podem funcionar como reservatórios de várias bactérias patogênicas. A *Acanthamoeba* alimenta-se de bactérias do ambiente por fagocitose e algumas dessas podem sobreviver e multiplicar-se no seu interior (PROCA-CIOBANU, 1975), o resultado dessa interação é ainda desconhecido (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). Em amostras obtidas de córnea humana foi encontrado um resultado positivo para endomutualistas (endossimbiontes) em 26% dos isolados e 24% nas amostras ambientais (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). Várias espécies de bactérias já foram descritas por análise molecular no citoplasma de AVL do gênero *Acanthamoeba*, como: *Legionella pneumofila* (ROWBOTHAM, 1980; HOLDEN, 1984; KILVINGTON e PRICE, 1990). *Mycobacterium avium* (CIRILLO, 1997), *Pseudomonas aeruginosa* (MICHEL, 1995), *Mycobacterium leprae*, *Helicobacter pylori*, espécies do gênero *Listeria* e outras dos gêneros *Rickettsia* e *Chlamidia*, (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). A sobrevivência e o crescimento intracelular de bactérias em AVL podem prepará-las para um melhor crescimento em células de mamíferos (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). Esses fatos mostram a significância epidemiológica da presença de *Acanthamoeba* em ambiente hospitalar como potencial veiculador de disseminação de infecções em humanos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Isolamento de amebas de vida livre, em amostras de poeira de ambientes hospitalares e a identificação morfológica e molecular em nível de gênero dos isolados obtidos.

3.2. Objetivos específicos

1. Isolar AVL em poeira de ambiente hospitalar
2. Obter culturas clonadas de AVL
3. Axenizar amostras de AVL
4. Proceder a identificação morfológica e molecular em nível de gênero por técnicas de PCR (reação da polimerase em cadeia) e RFLP (Polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta e Isolamento de AVL

Amostras de poeira foram obtidas de diferentes pontos do Hospital de Clínicas da UFPR, Curitiba, Paraná com a aprovação do Diretor do Corpo Clínico Dr. Celso Fernando Ribeiro Araújo (**Anexo 1**).

As coletas foram feitas em novembro de 2006 e foram obtidas amostras dos seguintes ambientes: Setor de Cirurgia Geral, Setor de Infectologia, Setor de Transplante de Medula Óssea, Cozinha, Corredor do 4º andar, Unidade de Tratamento Intensivo (UTI Adulto), Unidade de Tratamento Intensivo (UTI pediátrica), Setor de Enfermaria de Adultos, Setor de Enfermaria pediátrica e Setor de Oftalmologia. Para as coletas luvas esterilizadas e máscaras cirúrgicas foram usadas e trocadas em cada ambiente, evitando o transporte de material de um ponto para outro. Em cada ambiente foram usados dois “swabs” de algodão esterilizados, passados de maneira aleatória pelo piso e mobiliário de cada ponto de coleta, totalizando vinte amostras nessa coleta (**Tabela 1**).

No período de Fevereiro de 2007 foram feitas novas coletas em um

número menor de pontos, pois neste momento o HC estava passando por reforma e pintura em vários setores, o que poderia alterar os resultados, foram então selecionados os pontos onde não havia obras, tais como: o Setor de Cirurgia Geral, Corredor do 4º andar, Unidade de Tratamento Intensivo (UTI Adulto), Setor de Enfermaria de Adultos, e Setor de Oftalmologia. Nesta coleta foram obtidas dez amostras **(Tabela 1)**.

Para o isolamento de AVL, foi utilizado o meio Agar-soja (FORONDA,1979), preparado da seguinte forma: farinha de soja diluída em água destilada esterilizada, à razão de 0,2 g por 100 mL (2%). A suspensão foi deixada em repouso por 24 horas e depois filtrada em papel de filtro. Agar bacteriológico foi acrescentado à solução de farinha de soja filtrada, na proporção de 1,5%. O meio foi autoclavado a 121°C por quinze minutos e após resfriamento a aproximadamente 50°C, foi distribuído em placas de Petri (90 x 15 mm) ou em garrafas de cultivo celular (área de cultivo 25 cm²), preenchidas aproximadamente com 15 mL cada uma. Os “swabs” foram aplicados na camada de Agar-soja das garrafas de cultura, e posteriormente transportados ao laboratório e adicionados de 100 µL de *Escherichia coli* isoladas de fezes em meio Teague e crescidas por 24 horas a 37°C. As garrafas foram mantidas à temperatura ambiente e após 48 horas, foi realizada a primeira análise microscópica, por exame direto. Para isto, cerca de 2 mL de água destilada esterilizada foi aplicada à garrafa, e após agitação leve, parte da suspensão foi retirada para avaliação microscópica. Outra parte da suspensão foi retirada para repique em placas de Petri. Após 48 - 72 horas, as garrafas do isolamento original e as placas repicadas foram examinadas em microscópio invertido para verificação da presença de formas compatíveis com morfologia de AVL e de outros organismos contaminantes (exemplo: fungos e flagelados).

Durante o mês de dezembro de 2006 as amostras coletadas no final de novembro desenvolveram fungos e foram descartadas. Das amostras coletadas no mês de fevereiro foram feitos repiques subseqüentes buscando eliminar os contaminantes fúngicos, por meio de seleção e transferência de áreas do Agar, onde estes organismos não estavam presentes, para novas placas de cultivo **(Tabela 1)**.

Os isolados assim obtidos receberam as seguintes denominações, de acordo com o ponto do Hospital de Clínicas em que foram coletados e com o meio de cultivo polixenico (px): CGpx (do Setor de Cirurgia Geral), CORpx (Corredor do 4º

andar), UTIpx (da Unidade de Tratamento Intensivo adulto), ENFpx (Setor de Enfermaria de Adultos) e OFTpx (Setor de Oftalmologia).

4.2. Identificação Morfológica de AVL encontradas nos isolados

As AVL das amostras obtidas em meio Agar-soja foram identificadas por critérios morfológicos, com base na movimentação e aspecto dos trofozoítos (SCHUSTER e VISVESVARA, 2004) e morfologia dos cistos de acordo com os critérios de PUSSARD e PONS (1977) (**Tabela 1**). Quando identificadas populações de cistos de morfologia similar, foi realizada a medida do diâmetro dos mesmos com ocular milimetrada, foram medidos 20 cistos, para a obtenção de uma média.

4.3. Clonagem de trofozoítos cultivados em Agar soja

Para obter populações homogêneas de AVL, foi realizada a clonagem de trofozoítos do isolado OFT, empregando-se uma técnica de diluição. A amostra OFTpx foi escolhida por ser representativa dos dois padrões morfológicos encontrados em todas as amostras (**Tabela 1**). Os trofozoítos da cultura foram suspensos em água destilada esterilizada e contados em câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada para 200 trofozoítos/mL (estimativa de 1 trofozoíto a cada 5 μ L) e esta suspensão foi distribuída, em volumes de 1,5 e 5 μ L, em campos da placa de meio Agar-soja novo, delimitados externamente com caneta. Após 24 a 48 horas os campos foram examinados em microscópio invertido para seleção daqueles onde foram constatados trofozoítos. O índice de positividade do processo de clonagem foi avaliado por meio da comparação entre a proporção de campos positivos para trofozoítos quando se utilizou volumes de 5 μ L ou de 1,5 μ L/mL no processo. Detectada a presença de trofozoítos no campo, um fragmento do mesmo foi transferido a outra placa, com auxílio de pipeta e pinça esterilizadas. Três clones foram escolhidos ao acaso e cada um deles foi reclonado mais duas vezes sucessivas, sendo denominados OFTpxclA3, OFTpxclB3 e OFTpxclC3.

4.4. Obtenção de culturas axênicas

4.4.1. Meio para cultivo

Para axenização de isolados de AVL, foi utilizado o meio PYG (RAUBOTHAN,1983), preparado com os reagentes e respectivas quantidades especificadas no **Anexo 2**. Os sais foram dissolvidos na ordem especificada na tabela, para evitar precipitação. O meio foi autoclavado a 121°C por 15 min e depois de resfriado, foi distribuído em tubos de vidro com tampa rosqueável (120 x 11 mm) e acondicionados em geladeira até o uso. A axenização visa obter amebas pura para a análise molecular e comparar os perfis de amplificação das culturas em diferentes condições de cultivo.

4.4.2. Procedimento de axenização

Para as tentativas de axenização, foram utilizados os isolados UTIpx, ENFpx, OFTpx e as culturas clonadas OFTApxlA3, OFTpxclB3 e OFTpxclC3 (**Tabela 1**), com 72 horas de cultivo ou mais, fase em que apresentam a presença predominante de cistos.

Os cistos foram recuperados da placa por lavagem com 5 mL de água destilada esterilizada e transferidos a tubos de cultura. Cerca de 10^5 a 10^6 cistos foram obtidos desta forma. O sedimento contendo os cistos foi lavado 3 vezes por centrifugação a 150 xg em água destilada e suspenso em 1mL de água destilada, acrescentando-se miconazol (10 mg/mL), Ceftriaxona (125 mg/mL) e enrofloxacin (0,5 mg/mL). Os cistos foram mantidos *overnight* a 4°C e depois lavados novamente por centrifugação, sendo então transferidos a tubos de cultura (120 x 11 mm) com 5 mL de meio PYG, contendo estreptomicina na concentração final de 250 µg/mL. Os tubos foram incubados a 26°C em posição inclinada. O crescimento de trofozoítos foi avaliado por microscópio óptico invertido a partir do 5º dia após o plantio. Quando observados trofozoítos, os repiques foram feitos em intervalos de 2 a 3 semanas.

4.4.3. Indução de encistamento

Para obter cistos em cultivo axênico, tubos de culturas em fase exponencial de crescimento (1 semana) foram centrifugados a 300 xg e transferidos para tubos contendo 5 mL de meio de encistamento de NEFF (1964) modificado (**Anexo 3**). O sedimento foi examinado para detectar a presença de cistos.

Tabela 1: Índice de positividade das observações microscópicas, clonagens e axenização dos isolados de AVL nos meses de novembro de 2006 e fevereiro de 2007

Locais de isolamento	Observação microscópica de formas de AVL	Manutenção da cultura	Clonagem	Axenização
1. Cirurgia Geral (Novembro). Swab 1 e 2	Cistos e Trofozoítos	Não realizada	Não realizada	Não realizada
2. Infectologia (Novembro). Swab 1 e 2	Cistos e Trofozoítos	Não realizada	Não realizada	Não realizada
3. Transplante. Méd. óssea (Novembro). Swab 1 e 2	Cistos e Trofozoítos	Não realizada	Não realizada	Não realizada
4. Cozinha (Novembro). Swab 1 e 2	Cistos e Trofozoítos	Não realizada	Não realizada	Não realizada
5. Corredor 4º andar (Novembro). Swab 1 e 2	Cistos e Trofozoítos	Não realizada	Não realizada	Não realizada
6. UTI Adulto (Novembro).	Cistos e Trofozoítos	Não realizada	Não realizada	Não realizada
7. UTI Pediátrica (Novembro). Swab 1 e 2	Cistos e Trofozoítos	Não realizada	Não realizada	Não realizada
8. Enfermaria Adulto (Novembro). Swab 1 e 2	Cistos e Trofozoítos	Não realizada	Não realizada	Não realizada
9. Enfermaria Pediátrica (Novembro). Swab 1 e 2	Cistos e Trofozoítos	Não realizada	Não realizada	Não realizada
10. Oftalmologia (Novembro). Swab 1 e 2	Cistos e Trofozoítos	Não realizada	Não realizada	Não realizada
11. Cirurgia Geral (fevereiro). Swab 1 e 2	Cistos e Trofozoítos	Positiva	Não realizada	Não realizada
12. Corredor 4º andar (fevereiro). Swab 1 e 2	Cistos e Trofozoítos	Positiva	Não realizada	Não realizada
13. UTI Adulto (fevereiro). Swab 1 e 2	Cistos e Trofozoítos	Positiva	Não realizada	Positiva
14. Enfermaria Adulto (fevereiro). Swab 1 e 2	Cistos e Trofozoítos	Positiva	Não realizada	Positiva
15. Oftalmologia (fevereiro). Swab 1 e 2	Cistos e Trofozoítos	Positiva	Positiva	Positiva

4.5. Clonagem em cultivo axênico

Na amostra OFT axênica, foi testada a clonagem por diluição limitante, utilizando-se trofozoítos em fase exponencial de crescimento, diluídos a 200 formas /mL e distribuídos em volumes de 3 a 5 µL em placa de cultivo de 24 poços. Nesta técnica, cada volume foi individualmente observado em microscópio invertido para constatar a presença de um único trofozoíto. Os poços com um trofozoíto foram preenchidos com 2 mL de meio PYG e incubados a 26°C por até 20 dias.

Outra técnica testada foi a clonagem em meio semi-sólido, com base no protocolo de GILLIN e DIAMOND (1978), usado para clonagem de *Entamoeba histolytica* axênica. Meio PYG contendo Agar a 5% (PYG-Agar5), esterilizado e solubilizado em microondas, foi mantido a temperatura de 45°C em banho-maria. Quantidades de PYG-Agar5 foram adicionados a tubos cônicos com PYG puro, de modo a obter concentrações finais de 0,5% e 0,7% de Agar. Os tubos foram homogeneizados por inversão e colocados em banho-maria a 45°C por mais cinco minutos e em seguida, foram adicionados cinquenta trofozoítos e cem trofozoítos em volumes de no máximo 500 µL. Desta forma, dois tubos com Agar a 0,7% continham cinquenta e cem trofozoítos cada e dois tubos com Agar a 0,5% continham cinquenta e cem trofozoítos cada. Após homogeneização, o conteúdo foi individualmente transferido a placa de Petri (90 x 15 mm), colocada em banho de gelo por cinco minutos. As placas foram incubadas em estufa a 26°C e examinadas diariamente para observar o crescimento de colônias. Observado o crescimento de trofozoítos, foram selecionadas as colônias mais isoladas, as quais foram coletadas do meio semi-sólido e transferidas ao meio de cultivo, com auxílio de pipeta de Pasteur e pinça esterilizadas. As culturas assim obtidas foram incubadas a 26°C para a multiplicação dos trofozoítos.

5. Identificação Molecular das Amostras de AVL

5.1. Extração de DNA

Trofozoítos de culturas em fase exponencial de crescimento foram obtidos de culturas em ágar-soja com bactérias ou de culturas axênicas no meio PYG.

Para recuperação dos trofozoítos da placa de ágar-soja, foi acrescentada à mesma cerca de 5 mL de água destilada esterilizada. Com auxílio de pipeta de Pasteur, a água foi aspirada e instilada várias vezes sobre a superfície do meio para desprender os trofozoítos e a suspensão foi transferida a tubo cônico de 15 mL. A amostra foi lavada três vezes por centrifugação a 300 x g, 10 minutos e o sedimento suspenso em 2 a 5 mL de água. As culturas em PYG foram lavadas 3 vezes em água destilada esterilizada, por centrifugação a 300 x g, 10 minutos e os trofozoítos suspensos em volume final de 2 mL. Os trofozoítos das amostras foram contados em câmara de Neubauer, centrifugados novamente e transferidos a microtubo de 1,5 mL. Após nova centrifugação a 300 x g por 5 minutos, o

sobrenadante foi desprezado e o sedimento usado para a extração de DNA.

O sedimento de células foi suspenso em tampão TEN (Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, NaCl 400 mM, Triton X-100 a 2%), acrescentando-se 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), na proporção aproximada de 500 µL de tampão de lise a cada 1×10^6 a 5×10^6 trofozoítos. Imediatamente, foi adicionada proteinase K (concentração final de 1 µg/µL). Após homogeneização suave, as preparações foram incubadas por 2 horas a 55°C. A extração de proteína foi realizada acrescentando-se igual volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e após homogeneização por inversão por 10 minutos o material foi centrifugado a 1500 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, repetindo-se a extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico e depois com clorofórmio-álcool isoamílico 24:1. O DNA foi precipitado por adição de dois volumes de etanol 96% e após centrifugação a 5000 x g, 10 minutos, o material foi lavado uma vez com etanol a 70% e seco à temperatura ambiente *overnight*. O DNA foi re-hidratado em 50 a 100 µL de água ultra-pura esterilizada. As concentrações de DNA foram determinadas por espectrofotometria em espectrofotômetro Shimadzu UV-160 a 260 nm e a qualidade do DNA aferida por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

Uma amostra de *Acanthamoeba* isolada de córnea de indivíduo com ceratite (isolado WAL cultivada em Agar-soja), gentilmente cedida pela Dra. Cinthia Furst Leroy Gomes, da Universidade Federal do Espírito Santo, foi usada como controle positivo. DNA extraído de *Entamoeba moshkovski* e *Entamoeba histolytica* e *Naegleria* sp. (amostra gentilmente cedida pela Profa. Dra. Annette Silva Foronda, FMU-SP) foram utilizados para testar a especificidade.

5.2. Reação em cadeia da polimerase - PCR

Foi realizada a PCR para confirmação do gênero dos isolados estudados, com base no protocolo de KHAN e PAGET (2002), que utilizaram iniciadores (*primers*) que amplificam região do rDNA 18S em amostras de *Acanthamoeba*. Os *primers* usados foram Foward: 5' - TTTGAATTCGCTCCAATAGCGTATATTAA - 3', e Reverse: 5'- TTTGAATTCAGAAAGAGCTATCAATCTGT -3'. A reação de PCR foi realizada em volumes de 25 µL, contendo 4 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, 0,2 U de Taq polimerase (Cenbiot ®), 0,5 µM dos *primers* e 1 a 2 µL de DNA molde diluído 1:10. Também foi testada reação onde se empregou adicionalmente 1 µg/µL de BSA. As reações foram realizadas seguindo uma

desnaturação inicial a 94°C, por 4 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C, por 1 minuto, anelamento a 55°C, por 1 minuto e extensão a 72°C, por 2 minutos, seguidos de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizados por coloração com brometo de etídio.

5.3. Distinção de populações por Polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição

Os produtos obtidos da amplificação por PCR foram submetidos ao corte com a enzima *Hae* III (Life Technologies) visando verificar se haverá distinção filogenética entre os isolados. Cada reação de corte foi realizada em volume de 15 µL, contendo 5 U da enzima *Hae* III (1,5 µL de tampão 10X, 3 µL de H₂O ultra-pura esterilizada e 0,5 µL da enzima a 10 U/µL). Os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio e fotodocumentados. A análise do peso molecular dos perfis obtidos foi realizado usando-se o programa Gel – Pro analyser.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Isolamento de AVL em ambiente hospitalar

Foram encontrados cistos de AVL nas trinta amostras de diferentes pontos de coleta do Hospital de Clínicas. Os isolados obtidos em meio Agar-soja com bactérias e mantidos em cultura no laboratório foram denominados CGpx, CORpx, OFTpx, UTIpx e ENFpx.

Formas amebóides foram detectadas nas amostras de 48h a 5 dias após o plantio. Estas apresentavam acantopódios e vacúolos pulsáteis evidentes. Outros organismos presentes nas amostras na fase inicial de isolamento, além das amebas e bactérias, foram fungos e protozoários flagelados. Após três a seis dias os trofozoítos começavam a desaparecer e as formas císticas tornavam-se mais numerosas. No entanto, notava-se também maior proliferação dos contaminantes fúngicos e protozoários flagelados. A partir da terceira passagem, os repiques foram realizados por recuperação de cistos e/ou trofozoítos de áreas da placa onde se observava menor quantidade de contaminantes. Neste caso, partes do Agar foram retiradas com ponta da pipeta de Pasteur e transferidas para outra

placa, com a face de cima em contato com a superfície do novo meio. Esta estratégia permitiu que, nos repiques subseqüentes, fossem recuperados trofozoítos em pontos distantes do crescimento das hifas de fungos e sem a presença de protozoários flagelados, este procedimento foi realizado apenas nas amostras coletadas no mês de fevereiro de 2007, que se mantinham próximos ao fragmento de Agar da placa anterior. Por meio deste procedimento, as bactérias presentes foram mantidas, o que é essencial no cultivo, já que servem como suplemento nutricional para amebas em meios não nutrientes ou com baixo teor de nutrientes como o Agar-soja utilizado.

Segundo SCHUSTER (2002), a maior dificuldade no isolamento de AVL de amostras do ambiente é estimular o crescimento das amebas e, ao mesmo tempo, inibir o desenvolvimento de outros organismos. Com a estratégia de selecionar áreas do meio de cultura sem os contaminantes (fungos e protozoários), foi possível obter culturas de AVL apropriadas para os experimentos subseqüentes.

Os relatos de AVL potencialmente patogênicas isoladas em poeira de ambiente hospitalar são escassos (FIELDS, 1989; SILVA, 2001). Esses locais abrigam pacientes debilitados que apresentam sérios riscos para desenvolver doenças ou adquirir infecções oportunistas.

Sendo estes protozoários organismos potencialmente causadores de infecções de curso fatal ou infecções de córnea de difícil tratamento, é importante saber quais espécies, e onde são encontrados para que se possam executar ações de vigilância epidemiológica, como por exemplo, em ambientes hospitalares onde se encontram pessoas debilitadas e mais susceptíveis a infecções oportunistas.

6.2. Identificação Morfológica dos Isolados de AVL.

Segundo FERRANTE (1991) os cistos da *Acanthamoeba* não são invasivos, e as únicas formas com poder infeccioso são os trofozoítos, mas os cistos podem se transformar em trofozoítos rapidamente em condições apropriadas (MARTINEZ, et al, 1994; SCHUSTER e VISVESVARA, 2004; SILVA e ROSA, 2003).

A observação microscópica dos isolados permitiu a identificação preliminar dos isolados como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*. Os cistos de

Acanthamoeba foram encontrados em todos os ambientes analisados no Hospital de Clínicas da UFPR em Curitiba.

Os trofozoítos foram reconhecidos pela presença de projeções filiformes (acantopódios) além de vacúolos contráteis (**Figura 4- a, b**). Estas características aliadas à movimentação lenta de 2- 4 $\mu\text{m/s}$ permitem facilmente a identificação do gênero (SCHUSTER E VISVESVARA, 2004). Os cistos, por sua vez, foram caracterizados pela parede dupla, sendo a parede externa ou ectocisto de aspecto liso ou ondulado e a mais interna ou endocisto apresentando forma estrelada ou poligonal. Os dois envoltórios encontravam-se evidentemente separados entre si (**Figura 4- c, d**). Dois tipos predominantes de cistos foram observados nas amostras, com características bem definidas (**Figura 5**):

Tipo 1, com tamanho médio 18,2 μm em OFTpx, 18,19 μm em ENFpx e 18,3 μm em UTIpx; o ectocisto apresentou formato esférico claramente separado do endocisto. Este apresentava forma de estrela de 4, 5 e 6 braços de aspecto cônico. Estas características estão de acordo com a classificação de PUSSARD E PONS (1977) para as amebas pertencentes do grupo I.

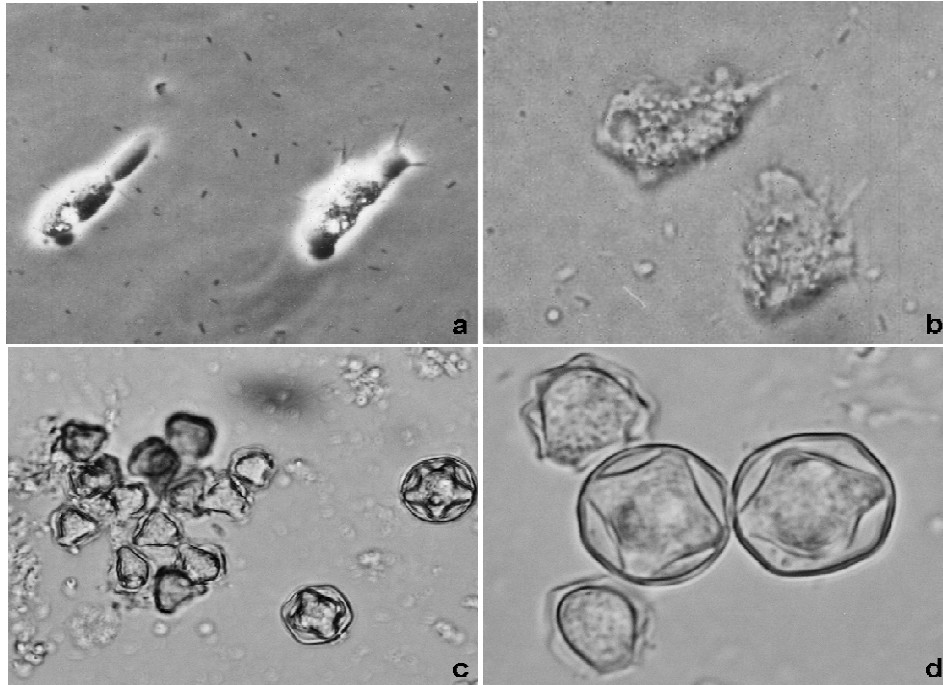


Figura 4: *Acanthamoeba* sp. encontrada em poeira de diferentes ambientes do Hospital de Clínica da UFPR. a) trofozoítos (microscopia de contraste de fase) 100X, b) trofozoítos 1000X; c) cistos, 100X; d) cistos, 1000X.

Neste grupo encontram-se espécies não patogênicas como: *A. astronyxis*, *A. commandoni*, *A. echinulata*, *A. pearcei* e *A. tubiashi*. Segundo a classificação de PAGE (1967) este isolado poderia enquadrar-se na espécie

A. astronyxis, onde o número de braços pode variar de 3 a 7, todos no mesmo plano, sendo tanto longos quanto largos e iguais entre si. As suas extremidades são redondas e largas. O ectocisto não é ondulado nem pregueado e é mais espesso que o endocisto.

Tipo 2: Cistos de tamanho inferior a 18 μ m de diâmetro (média de 16,2 μ m em OFTpx e de 15,97 μ m em UTIpx) com um ectocisto pregueado acompanhando o contorno do endocisto, de aspecto predominantemente triangular. Estas características os enquadram no grupo II de PUSSARD e PONS (1977), onde estão as AVL mais comumente isoladas do ambiente (PAGE,1967). Neste grupo estão também as AVL que mais frequentemente são isoladas nos casos e meningocéfalites e ceratites (STOTHART et al, 1998). São representadas por onze espécies: *A. castellanii*, *A. divionensis*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. lugdunensis*, *A. mauritaniensis*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhyodes*, *A. stevensoni* e *A. triangularis*. Segundo a classificação de PAGE (1967) estes isolados poderiam ser enquadrados na espécie *A. triangularis* devido ao aspecto geométrico no endocisto, com contornos particularmente bem evidentes do triângulo isósceles, equilátero ou na forma de losango. A exina do ectocisto é mais espessa que a intina, ela é fortemente ondulada e seu contorno não se apresenta circular.



Figura 5: Morfologia de cistos encontrados nas amostras OFT (1 e 2), UTI (1 e 2) e ENF (1). 400X

Nos isolados CG, COR, OFT e UTI, ambos os tipos de cistos foram encontrados, ao passo que no isolado ENF apenas o primeiro tipo foi observado. Não foi realizada a medida de diâmetro de CG e COR por que estas amostras

desenvolveram grande número de colônias de fungos e foram então descartadas.

Um dos trabalhos mais relevantes na descrição morfológica das AVL do gênero *Acanthamoeba* foi o trabalho de PAGE (1967), que descreve 14 espécies usando apenas critérios morfológicos. No entanto, deve-se ressaltar que a caracterização específica é pouco precisa, já que a distinção entre as espécies por critérios morfológicos é difícil de ser estabelecida com segurança (KHAN e PAGET, 2001; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; SILVA e ROSA, 2003). Por este motivo, tem-se empregado, com mais frequência, a classificação por grupos de PUSSARD e PONS (1977), que classifica *Acanthamoeba* em 3 grupos, de acordo com características de tamanho e de aspectos morfológicos gerais. Neste trabalho, embora tenha ficado evidente a ocorrência de duas populações bem caracterizadas de cistos, a classificação em nível de espécies foi apenas sugestiva, pois algumas variações morfológicas podem ocorrer, como por exemplo, no número de braços do endocisto. Atualmente, a classificação específica tem sido realizada com ferramentas moleculares (STOTHARD et al, 1998).

6.3. Clonagem de trofozoítos em cultivo com bactérias

Considerando que 4 dos 5 isolados que se mantiveram em cultivo apresentavam 2 populações de cistos bem distintas (classificados neste trabalho como tipos 1 e 2). Selecionamos um destes isolados, oft px para realizar a clonagem, visando obter populações homogêneas.

No processo de clonagem, trofozoítos em multiplicação foram visualizados mais facilmente nos campos da placa após 48 horas, fase em que começavam a ultrapassar a zona de crescimento bacteriano (**Figura 6**).

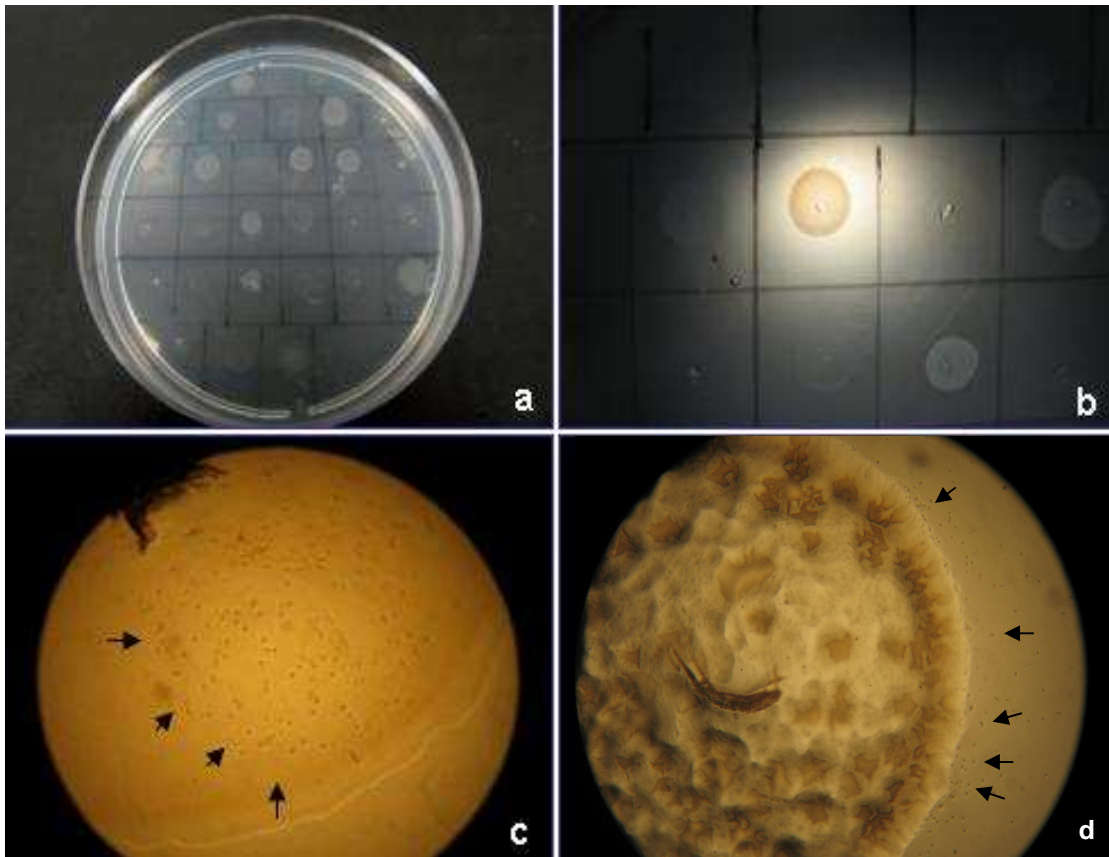


Figura 6: Clonagem de trofozoítos de *Acanthamoeba* cultivados em Agar-soja. **a-** placa de Petri com Agar-soja, com os campos aonde são colocadas volumes de 1,5 - 5 μ L de suspensão de 200 trofozoítos/mL, **b-** detalhe de um campo contendo trofozoítos em multiplicação (10X), **c-** o mesmo campo anterior em aumento de 40X. As setas indicam os trofozoítos, **d-** outro campo com trofozoítos em multiplicação (setas), ultrapassando a zona de crescimento bacteriano.

Na avaliação dos processos de clonagem, testando-se o uso de volumes de 1,5 μ L ou 5 μ L, obtiveram-se índices de positividade diferentes, de respectivamente 25,2% e 54% (**Tabela 2**).

Tabela 2: Índice de positividade das clonagens da amostra OFT, usando volumes de 5 e 1,5 μ L de suspensão com 200 trofozoítos/mL.

Experimento	Volumes	
	5 μ L	1,5 μ L
1	6/12 (50%)	2/11 (18,1%)
2	8/13 (61,53%)	4/11 (36,4%)
3	7/12 (58,3%)	2/10 (20%)
Média	7/13 (54%)	2,7/10,7 (25,2%)

Considerando o menor número de campos positivos quando se utilizou volumes de 1,5 μ L, a clonagem com distribuição de volumes com esta quantidade foi adotada para a obtenção dos clones definitivos. Neste caso, a chance de se

ter selecionado mais de um trofozoíto na distribuição dos volumes seria menor do que usando volumes maiores de 5 μ L.

Dos campos positivos, selecionou-se ao acaso três clones, que posteriormente foram recloneados mais duas vezes consecutivas para garantir a homogeneidade das culturas, denominadas OFTpxclA3, OFTpxclB3 e OFTpxclC3. Todas as culturas clonadas apresentaram cistos do tipo 2, compatíveis com a morfologia do grupo II de PUSSARD E PONS (1977) (**Figura 7**). Observou-se que, embora apresentassem as mesmas características estruturais básicas, houve variação na morfologia de alguns cistos de uma mesma cultura clonada, corroborando observações de autores sobre variações na morfologia cística (STRATFORD e GRIFFITH, 1978).



Figura 7: Morfologia de cistos encontrados nos clones OFT clA3, OFT clB3 e OFT clC3.

6.4. Axenização de AVL

Das culturas selecionadas para axenização, os isolados UTI, ENF e OFT cresceram adequadamente no meio PYG, sendo observados trofozoítos em 5 dias após o plantio dos cistos. Os trofozoítos destas culturas apresentaram morfologia típica, com pseudópodes filópodes (**Figura 8**). Os cistos foram observados nas culturas sempre em pequena quantidade e após intervalos de cultivo maiores que quatro semanas. Por este motivo, os trofozoítos foram colocados em meio de encistamento e após duas semanas foi encontrado maior

número de cistos. Nas três culturas axenizadas os cistos apresentaram morfologia do tipo 1, compatível com o grupo I de PUSSARD e PONS (1977) (**Figura 8 c, d**). Não foi possível axenizar as culturas clonadas OFTpxclA3, OFTpxclB3 e OFTpxclC3, a despeito de várias tentativas.

No presente trabalho, a axenização dos isolados UTI, ENF e OFT selecionou apenas a população de morfologia cística compatível com o grupo I, enquanto que as culturas clonadas OFTpxclA3, OFTpxclB3 e OFTpxclC3, pertencentes ao grupo II, não cresceram em cultivo axênico. De acordo com SCHUSTER (2002), algumas espécies de *Acanthamoeba* exigem meios definidos, contendo uma série de aminoácidos e vitaminas, para que possam crescer em cultivo axênico. Este pode ser o caso das *Acanthamoeba* do grupo II isoladas neste trabalho.

A axenização das amostras foi realizada para obter culturas livres de bactérias, já que posteriormente estas amostras seriam processadas para identificação molecular e seria interessante a comparação dos resultados da PCR quando usadas amostras polixênicas (Ágar-soja) e axênicas (PYG).

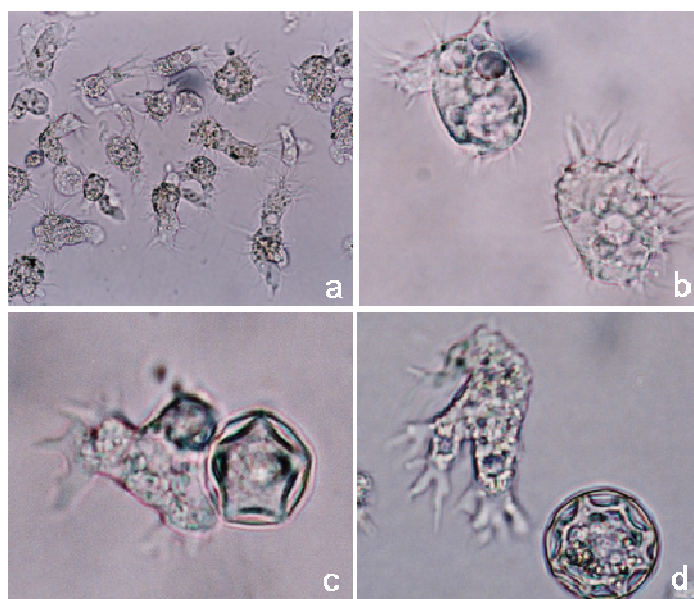


Figura 8: Trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba* em cultivo axênico. Aumento: a) 100X; b-d) 400X.

6.5. Clonagem em cultivo axênico

Várias tentativas de clonagem de trofozoítos da cultura OFT axênica utilizando a técnica de diluição limitante foram realizadas, no entanto não foi possível obter clones deste modo. Com isto, testou-se outra técnica de

clonagem, em Agar semi-sólido, buscando reproduzir um método proposto por GILLIN e DIAMOND (1978) para clonar *E. histolytica* em cultivo axênico. Foi possível obter colônias isoladas, visíveis macroscopicamente após sete dias de incubação a 26°C, apresentando cerca de 1 mm **(Figura 9)**. O número de colônias observado nas placas variou em função do inóculo e aparentemente não houve diferença notável em função das concentrações de Agar de 0,5% e 0,7% usadas. **(Tabela 3)**.

Tabela 3: Índice de positividade na clonagem em Agar semi-sólido, usando a cultura OFT ax.

Concentração de Agar	Índice de positividade	
	50 trofoz. inocul.	100 trofoz. inocul.
0,5%	36	46
0,7%	35	61

Para estabelecer as culturas clonadas, foram escolhidas colônias bem isoladas e afastadas de outras, na placa com Agar 0,7% onde foram inoculados 50 trofozoítos. Foram estabelecidas 5 culturas denominadas OFTaxA, OFTaxB, OFTaxC, OFTaxD e OFTaxE. Estas culturas foram também transferidas a meio de encistamento para obtenção de cistos, os quais apresentaram morfologia característica do grupo I, conforme observada na cultura original OFT axênica.

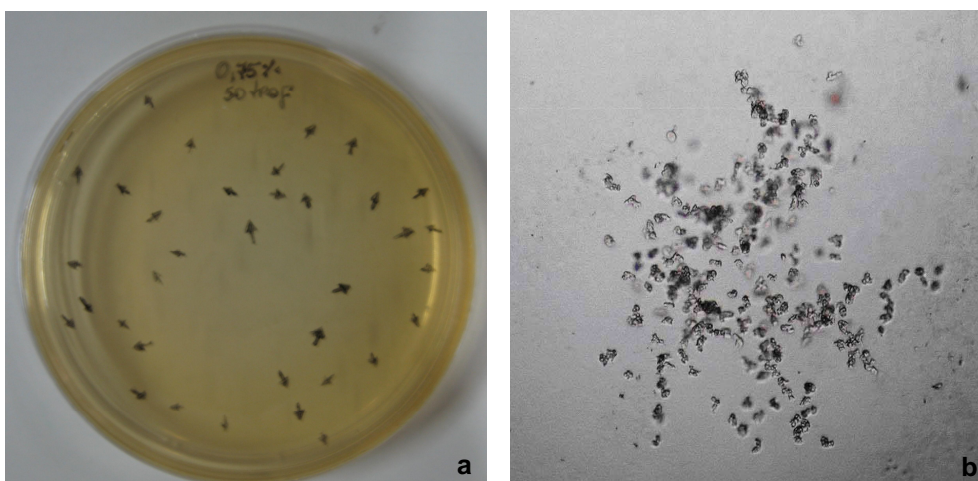


Figura 9: Placa de meio PYG com Agar a 0,7% com setas indicando as colônias presentes (a) e aspecto das colônias a microscopia (b) em aumento de 40X.

A técnica de clonagem em meio semi-sólido proposta por GILLIN e DIAMOND (1978a) foi empregada para obtenção de clones de *E. histolytica* e também para testar o efeito de drogas sobre a viabilidade dos parasitos (GILLIN

e DIAMOND (1978b), por meio da avaliação do número de colônias resultantes (índice de formação de colônias). No presente trabalho a técnica foi usada visando observar se alguma diferença morfológica e do perfil de amplificação obtido na PCR seria detectado, quando comparadas as diferentes culturas clonadas.

6.6. Identificação dos isolados por PCR

6.6.1. Extração de DNA

A técnica de extração utilizada permitiu obter DNA em quantidade detectável no gel de agarose 0,8% quando obtidos pelo menos 10^6 trofozoítos. A leitura em espectrofotômetro de algumas amostras em que o número de trofozoítos para extração variava de 10^6 a 10^7 , indicou quantidades de DNA de 182 a $\text{ng}/\mu\text{L}$. Amostras contendo cerca de 1×10^5 trofozoítos ou menos não forneciam quantidades adequadas, conforme demonstrado na **Figura 10**.

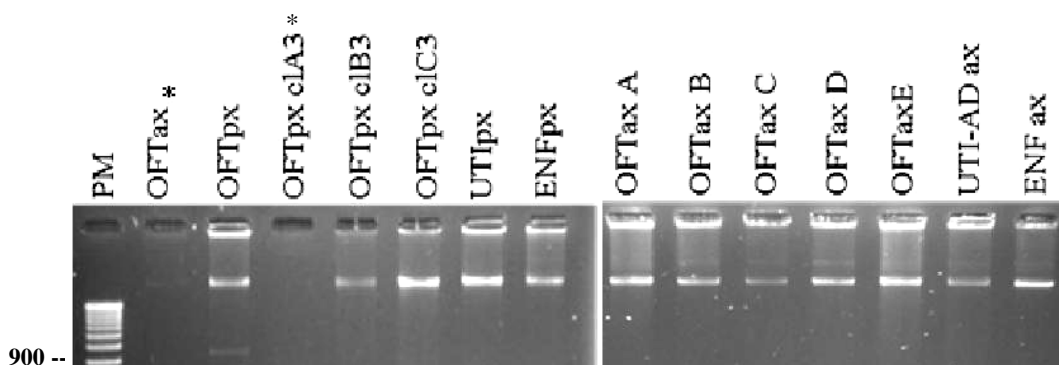


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 0,8% com amostras de DNA de *Acanthamoeba*, diluídas 1:4. Extração realizada de sedimentos contendo 10^6 a $1,2 \times 10^7$ trofozoítos, exceto as assinaladas com (*), cujas quantidades de trofozoítos para extração foi de 4×10^5 e 5×10^5 . PM: padrão de peso molecular.

6.6.2. PCR e RFLP

Na padronização da PCR para amplificação do fragmento do rDNA 18S de *Acanthamoeba*, resultados satisfatórios foram obtidos quando empregou-se BSA na concentração de $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Sem este aditivo, não houve amplificação dos produtos esperados, o que pode ser devido também a qualidade dos reagentes.

A amplificação do fragmento de rDNA 18S gerou produtos de tamanho 930 e 1100pb em 6 amostras de *Acanthamoeba*. Os dois produtos foram observados para OFTpx, UTIpx, CGpx e CORpx, enquanto que apenas o produto de 1100pb

foi amplificado em ENFpx e somente o produto de 930pb foi amplificado na amostra WALpx de córnea humana (**Figura 11**). As culturas clonadas a partir do isolado OFTpx apresentaram o produto de 930pb; as culturas axenizadas e os clones de OFTax apresentaram o produto de 1100pb (**Figura 12**). Produtos com peso molecular inferior a 800 pb foram observados nas amostras de *Naegleria*, *Entamoeba moshkovski* e *E. histolytica* (**Figuras 11 e 12a**). Os pesos moleculares dos fragmentos amplificados em amostras de *Acanthamoeba* estão dentro da faixa esperada, conforme descrito por KHAN e PAGET (2002).

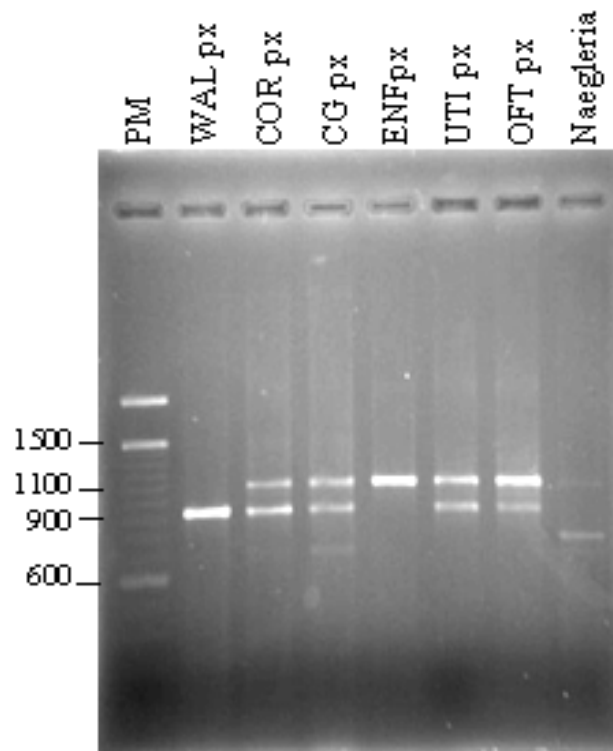


Figura 11: Produtos de amplificação do fragmento do rDNA 18S usando DNA de isolados *Acanthamoeba*, em cultivo com bactérias em Agar-soja e de *Naegleria sp.* PM: padrão de peso molecular.

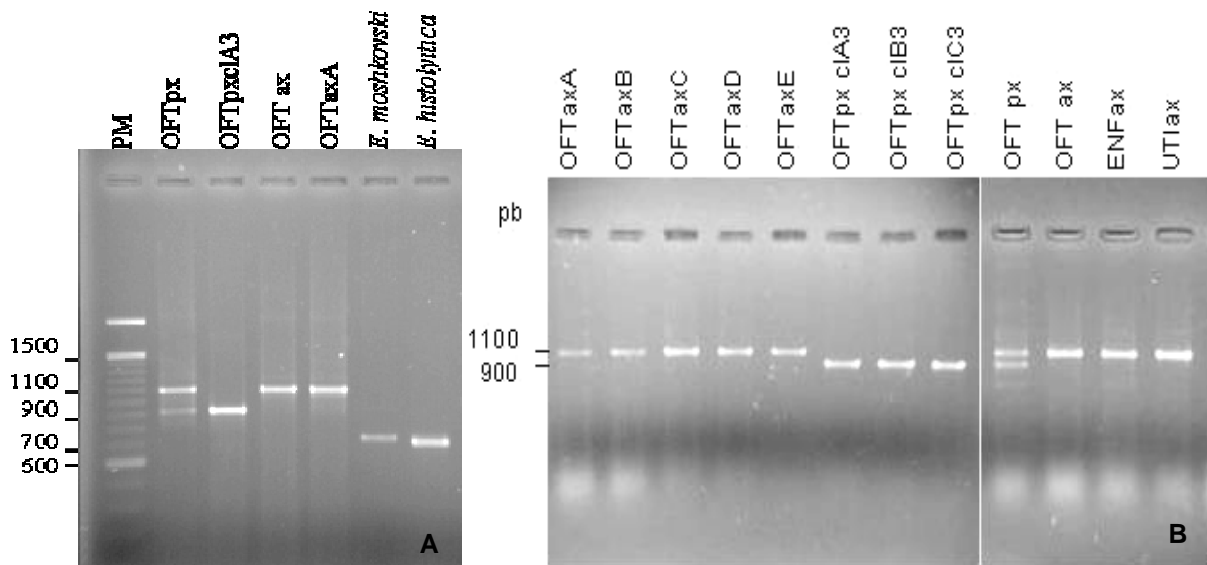


Figura 12: Produtos de amplificação do fragmento do rDNA 18S usando DNA de *Acanthamoeba* em cultivo com bactérias em Agar-soja (px) e cultivo axênico em meio PYG (ax) e de culturas clonadas a partir da amostra OFT. PM: padrão de peso molecular.

Os perfis de amplificação obtidos para todas as amostras estudadas foram esquematizados conforme a **Figura 13**. Considerando as amostras isoladas da poeira do Hospital de Clínicas, os tamanhos de fragmentos amplificados de 1100pb e 930pb corresponderam às populações de cistos com aspecto morfológico do grupo I e II de PUSSARD e PONS (1977), respectivamente. Entretanto, deve-se destacar que, embora variações no tamanho dos fragmentos tenham permitido confirmar a ocorrência de duas populações nas amostras deste trabalho, o par de *primers* usados é recomendado para identificação em nível de gênero. De fato, o isolado de córnea WALpx, usado como cepa referência, apresentou também o fragmento de 930pb na amplificação por PCR, sendo que a morfologia cística é nitidamente distinta da observada nas amostras de poeira do grupo II (**Figura 13**).

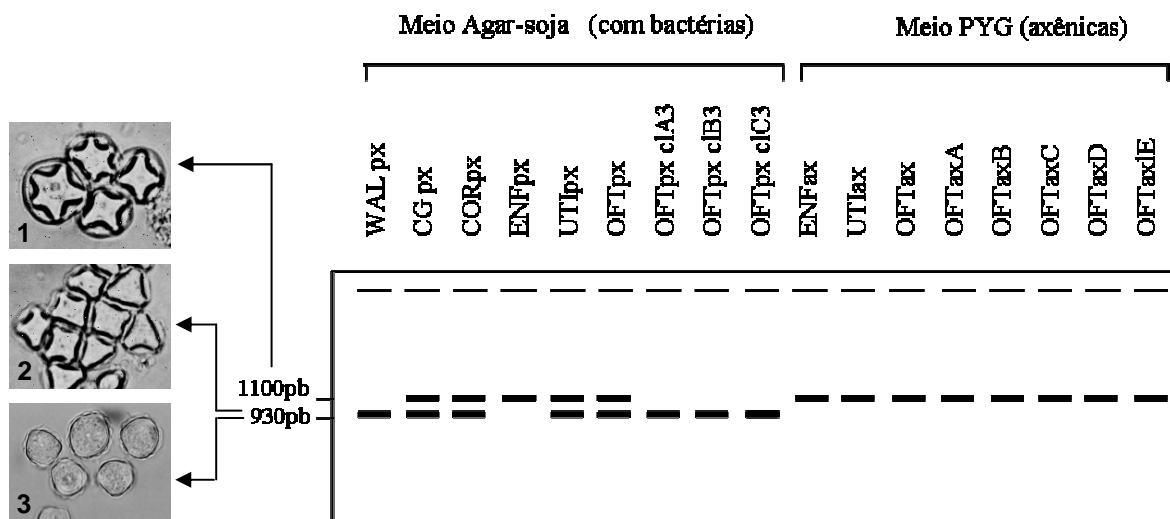


Figura 13 : Esquema dos perfis de amplificação do fragmento gênico do rDNA 18S e da morfologia dos cistos em amostras de *Acanthamoeba* obtidas de poeira do Hospital de Clínicas da UFPR (1 e 2) e do isolado clínico WALpx de paciente com ceratite (3).

Para se distinguir se a morfologia é diferente e o perfil molecular é o mesmo entre as amostras do grupo II e o isolado WAL px, foi testada a análise de restrição com a enzima *HaeIII*. Para isto, foram selecionados o isolado OFTpx, a cultura clonada OFTpxclA3 e a cultura clonada axênica OFTaxA, por serem representativas dos diferentes perfis de amplificação obtidos para *Acanthamoeba* nas amostras do presente trabalho. O corte dos produtos da PCR com a enzima *Hae III* gerou fragmentos de restrição menores que 650pb, sendo dois fragmentos de 650 e 600pb para OFTpx, um de 650pb para OFTpxA3 e WALpx e um de 600pb para OFTaxA (**Figura 14**).

KHAN e PAGET (2002) testaram três enzimas de restrição, entre elas *Hae III*, para cortar os produtos da PCR para o rDNA 18S de *Acanthamoeba* e compararam os perfis de restrição das amostras ambientais aos de algumas cepas de referência, a saber: *A. griffini*, *A. polyphaga*, *A. palestinensis* e *A. castellanii*. Por meio desta estratégia (RFLP), os autores obtiveram a identificação específica de vários isolados de *Acanthamoeba*. Comparando os perfis de restrição *Hae III* das cepas de referência do trabalho de KHAN e PAGET (2002), não foi possível encontrar nenhuma semelhança com os nossos perfis. Para se obter resultados conclusivos, outras enzimas poderiam ser utilizadas.

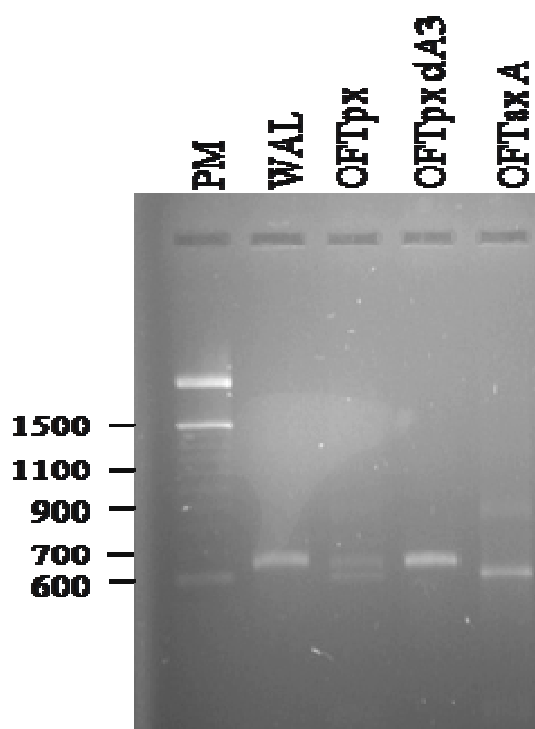


Figura 14 : Esquema dos perfis de amplificação do fragmento gênico do rDNA 18S em amostras de *Acanthamoeba* obtidas de poeira do Hospital de Clínicas da UFPR (exceto WALpx, isolado clínico de ceratite).

Em ambientes hospitalares, a ocorrência de AVL traz duas preocupações principais. A primeira refere-se ao fato de algumas delas serem patógenos oportunistas, podendo assim oferecer risco aos indivíduos debilitados ou imunocomprometidos. Outra preocupação, é que as AVL podem albergar microrganismos patogênicos e estes se desenvolvam no seu citoplasma o que pode aumentar o seu potencial infeccioso em humanos, após essa permanência temporária no seu interior (BARKER e BROWN, 1994; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). Uma variedade de bactérias de importância clínica pode sobreviver e multiplicar-se dentro de AVL do gênero *Acanthamoeba* (revisto por MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). *Legionella pneumophila*, por exemplo, é capaz de crescer dentro dos trofozoítos (HOLDEN et al, 1984) e resistir no interior de cistos submetidos a soluções de cloro a 50 ppm (KILVINGTON E PRICE, 1990). Também já foi demonstrado que *Cryptococcus neoformans*, um fungo encapsulado oportunista, causador da criptococose, sobrevive dentro de *Acanthamoeba* (STEENBERGEN et al., 2001).

O conhecimento de que AVL podem servir como veiculadora de agentes patogênicos tem levado a alguns estudos de sua ocorrência em hospitais (MICHEL e MENN, 1991; ROHR et al, 1998; MICHEL et al, 1995; THOMAS et al., 2006). A presença de AVL em equipamentos condutores de água em unidades odontológicas também já foi documentada (MICHEL e BORNEFF, 1989; SINGH e COOGAN, 2005). A maioria destes estudos diretamente associa o achado dos protozoários com a presença de microorganismos bacterianos de importância clínica e em todos eles, as áreas pesquisadas foram ambientes úmidos ou rede de água. A pesquisa de AVL em poeira de ambiente hospitalar foi assinalada apenas por SILVA e ROSA (2003), em um estudo realizado em Presidente Prudente-SP, onde os autores encontraram, após a coleta de várias amostras, um índice de positividade de 45,5% para *Acanthamoeba* e 3,8% para *Naegleria*.

Como as AVL são observadas no solo, água e ar e em outros ambientes, é de se esperar o contato muito intenso com os seres humanos, apesar disso a incidência de infecções por AVL é baixa (CERVA, 1989; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003) e ocorre principalmente em indivíduos imunodebilitados (CULBERTSON, 1958; FORONDA, 1979; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; SILVA e ROSA, 2003). Se a *Acanthamoeba* causa infecções passageiras em indivíduos saudáveis e estimula uma resposta de defesa do hospedeiro, que controla a infecção e resulta na eliminação organismo não se sabe (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003).

7. CONCLUSÃO

Este é o primeiro trabalho de isolamento de amebas de vida livre no ambiente realizado no Estado do Paraná.

1- Foram isoladas amostras de AVL de material coletado de poeira em ambiente hospitalar de todos os pontos de coleta (10 pontos com 30 amostras).

2- O cultivo em meio ágar-soja se mostrou muito eficiente tanto para o isolamento como para a manutenção das amostras.

3- Esses isolados foram identificados pela sua morfologia e por técnicas de biologia molecular como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*, e através da análise morfológica foram enquadrados em dois grupos taxonômicos (grupo I e II) de PUSSARD e PONS.

4- Das amostras isoladas e mantidas em laboratório foram obtidos clones individuais, o que permitiu uma análise mais segura na identificação morfológica e uma verificação de que culturas em laboratório podem apresentar morfologias distintas, mesmo sendo todas provenientes de um único local.

5- A análise por PCR padronizada no presente trabalho para o gênero *Acanthamoeba* foi conclusiva e os fragmentos amplificados encontrados apresentaram-se dentro da faixa esperada descrita na literatura pela técnica de PCR.

6- Observou-se, portanto, que não houve diferenciação no perfil de restrição *Hae* III entre WALpx e OFTpx cIA3, embora estas duas amostras apresentassem morfologia de cistos bem distinta.

8. PERSPECTIVAS

Para se ter um resultado favorável no tratamento de infecções por *Acanthamoeba* é muito importante um diagnóstico rápido e preciso, o que nem sempre ocorre. As infecções por *Acanthamoeba* são difíceis de serem caracterizadas devido a um desconhecimento dos profissionais de saúde e a uma dificuldade no isolamento e identificação dos laboratoristas, por serem poucos os casos e a falta de familiaridade com relação a esses organismos.

O uso de métodos moleculares para a identificação de *Acanthamoeba* em tecidos humanos pode dar um diagnóstico mais rápido e seguro da patologia.

Embora não haja relatos de casos de infecção diretamente relacionados à AVL em ambiente hospitalar, esta é uma possibilidade que deve ser considerada.

O processo de axenização abre novas perspectivas para outros estudos como a análise de proteases e de patogenicidade, sem a interferência de bactérias.

Por esses fatos descritos, pesquisar a presença de AVL em ambientes hospitalares e caracterizar morfológicamente e molecularmente em amostras de poeira hospitalar amebas do gênero *Acanthamoeba* é de crucial importância para avaliação dos possíveis riscos dos pacientes em contrair infecções por *Acanthamoeba* ou por microorganismos carregados por elas. Há, portanto uma necessidade de se alertar a comissão de infecção hospitalar e os profissionais de saúde para a ocorrência desses microorganismos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVARENGA, L. S.; FREITAS, D. 2003. Ceratite dendritiforme em usuários de lentes de contato. Arq. Bras. Oftalmol. 66: 4.
2. ALVES, J.M.P. 2001. Caracterização e filogenia moleculares de *Acanthamoeba*. Tese de doutorado. Inst. Cienc. Biom. Univ. São Paulo.
3. BARKER, J.; BROWN, M. R. 1994. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. Microbiology 140: 1253-59.
4. BIASOLI, W.M.; ARARIPE, C.A.; LIMA, J.M.O.; LOPES, E. 1981. Meningoencefalite amebiana de origem hídrica diagnosticada pelo exame do liquor. Apresentação de dois casos. Resumo do 15º Congr. Bras. Patol. Clin., São Paulo, p56.
5. BOWERS, B.; KORN E. D. 1968. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. J. Cell Biol., 39 (1): 95.
6. CAMPOS, R.; GOMES, M.C.D.; PRINGENZI, L.S.; STECCA, J. 1977. Meningoencefalite por ameba de vida livre. Apresentação do primeiro caso latino americano. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 19: 349-51.
7. CARTER, R. F. 1970. Description of a *Naegleria* sp isolated from cases of primary amebic meningoencephalitis and of the experimental pathological changes induced by it. J. Pathol., 100: 217-44.
8. CARVALHO, F.G.; MOURA, H.; GUIMARAES, F.D.; SALAZAR, H.C.; GONÇALVES, A.J.; LOMELINO, M.R.; ÁVILA, C.M. 1983. Meningoencefalite amebiana primaria. Relato de caso. Rev. Bras. Neurol., 19: 83-6.
9. CERVA, L. 1989. *Acanthamoeba culbertsoni* and *Naegleria fowleri*: occurrence of antibodies in man. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 33: 99-103
10. CHAVES, C.M.; ROCHA, A. A.; MELHEM, M.S.C.; SANTOS, R.; FORONDA, A. S.; BARROS, L.S.P.; BARAZA, A.M.C. 1985. Condições sanitárias de águas de piscinas de campo grande, Mato Grosso do Sul. Rev. DAE, 45: 88-94.
11. CHUNG, D.I.; YU, H. S.; HWANG, M. Y.; KIM, T. H.; KIM, T.O.; YUN, H. C.; KONG, H. H. 1998. Subgenus classification of *Acanthamoeba* by riboprinting. Korean J. Parasitol., 36 (2): 69-80.
12. CIRILLO, J. D., S.; FALKOW, L. S.; TOMPKINS.; BERMUDEZ, L. E.1997. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. Infect. Immun., 65: 3759-67.
13. CULBERTSON, C. G.; SMITH, J. W.; MINNER. H. 1958. *Acanthamoeba*: observations on animal Pathogenicity. Science, 127: 1506.
14. DE JONCKHEERE, JF. 2006. Isolation and molecular identification of free-living amoebae of the genus *Naegleria* from Arctic and sub-Antarctic regions. Eur. J. Protistol., 42 (2): 115-23.
15. DUNNEBACKE, T. H.; SCHUSTER, F. L.; YAGI, S.; BOOTON, G. C. 2004. *Balamuthia mandrillaris* from soil samples. Microbiology, 150: 2837-42.
16. FORONDA, A. S. 1979. Observações sobre amebas de vida livre potencialmente patogênicas. Tese de doutorado. Inst. Cienc. Biom. Univ. São Paulo.
17. FERNANDEZ M.C.A.; CRESPO, E.P. 1992. Las amebas de vida libre o anfizoica (Protozoa, Lobosea). Av. parasitol. Serv. Public. Univers. de Santiago de Compostela, 143-62.

18. FIELDS, B. S.; SANDEN, G. N.; BARBAREE, J. M.; MORRILL, W. E.; WADOWSKY, R. M.; WHITE, E. H.; FEELEY, J. C. 1989. Intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in amoebae isolated from hospital hot water tanks. *Curr. Microbiol.* 18: 131-37.
19. FERRANTE, A. 1991. Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. *Parasit. Immunol.* 13: 31-47.
20. GAST, R. J.; LEDEE, D. R.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. 1996. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43: 498–504.
21. GIAZZI J.F. 1996. Contribuição para o estudo do isolamento, cultivo e manutenção das amebas de vida livre. Tese de livre-docência. Facul. Ciênc. Farmac. Univ. Est. São Paulo.
22. GELMAN, B. B.; RAUF, S. J.; NADER, R.; POPOV, V.; BORKOWSKI, J.; CHALJUB, G.; NAUTA, H. W. 2001. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *JAMA.*, 285 : 2450-51.
23. GELMAN, B. B.; POPOV, V.; CHALJUB, G.; NADER, R.; RAUF, S. J.; NAUTA, H. W.; VISVESVARA, G. S. 2003. Neuropathological and Ultrastructural Features of Amebic Encephalitis Caused by *Sappinia diploidea*. *J. Neuropathol. Experim. Neurol.*, 62 (10): 990-98.
24. GILLIN, F.D.; DIAMOND, L.S. 1978. Growth of *Entamoeba histolytica* and others species of *Entamoeba* in agar. *J. Protozool.*, 25: 539-43.
25. GULLETT, J.; MILLS, J.; HADLEY, K.; PODEMSKI, B.; PITTS, L.; GELBER, R. 1979. Disseminated granulomatous acanthamoeba infection presenting as an unusual skin lesion. *Am. J. Med.* 67: 891-96.
26. HO-JOON; KYUNG, I. L. 2004. Pathogenic free-living amoebae in Korea. *Korean J. Parasitol.*, 42, (3): 93-119.
27. HOLDEN, E.P., WINKLER, H.H., WOOD, D.O., LEINBACH, E.D. 1984. Intracellular growth of *Legionella pneumophila* within *Acanthamoeba castellanii*. *Immunity*, 45 (1): 18-24.
28. JONCKHEERE, J.; VAN DE VOORDE, H. 1976. Differences in destruction of cysts of pathogenic and nonpathogenic Naegleria and *Acanthamoeba* by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31 (2): 294- 97.
29. JONCKHEERE, J.F. 1991. Ecology of *Acanthamoeba*. *Rev. Infect. Dis.* 13 (5): 385-87.
30. JONES, B.R.; MC GILL, J.I.; STEELE, A.D.M. 1975. Recurrent suppurative kerato-uveitis with loss of eye due to infection by *Acanthamoeba castellanii*. *Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.* 95: 210-13.
31. JONES, B. R.; VISVESVARA, G. S.; ROBINSON, N. M. 1975. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. *Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.* 95: 221-32.
32. KHAN, N. A.; JARROLL, E. L.; PAGET, T. A. 2001. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. *Curr. Microbiol.*, 43: 204-8.
33. KILVINGTON, S.; PRICE, J. 1990. Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J. Appl. Bacteriol.*, 68 (5), 519-25.
34. LEHMANN, O. J.; GREEN, S. M.; MORLET, N.; KILVINGTON, S.; KEYS, M. F.; MATHESON, M. M.; DART, J. K.; MCGILL, J. I.; WATT, P. J. 1998. Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.* 39: 1261-65.

35. LORENZO-MORALES, J. ; MONTEVERDE-MIRANDA, C. A.; JIMENEZ, C.; TEJEDOR, M.L.; VALLADARES, B.; ORTEGA-RIVAS, A. 2005. Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 12 (2): 233-6.
36. LORENZO-MORALES, J.; LINDO, J.F.; MARTINEZ, E.; CALDER, D.; FIGUERUELO, E.; VALLADARES, B.; ORTEGA-RIVAS, A. 2005. A. Pathogenic *Acanthamoeba* strains from water sources in Jamaica, West Indies. *Ann. Trop. Méd. Parasitol.*, 99(8):751-58.
37. LORENZO-MORALES, J.; ORTEGA-RIVAS, A.; MARTINEZ, E.; KHOUBBANE, M.; ARTIGAS, P.; PERIAGO, M.V.; FORONDA, P.; ABREU-ACOSTA, N.; VALLADARES, B.; MAS-COMA, S. 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 (1-2): 63-9.
38. MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16 (2): 273-307.
39. MARTINEZ, A. J.; JANITSCHKE, K. 1985. *Acanthamoeba*, an opportunistic Microorganism. *Review. Infection.*, 13: 251-56.
40. MARTINEZ, A. J.; SOTELO-AVILA, C.; GARCIA-TAMAYO, J., MORON, J. T.; WILLAERT E.; STAMM, W. P. 1977. Meningoencephalitis due to *Acanthamoeba* sp. Pathogenesis and clinico-pathological study. *Acta Neuropathol.*, 37:183-191
41. MARTINEZ, J. M.; GUERRA, A. E.; GARCIA-TAMAYO, J.; CÉSPEDES, G.; GONZÁLES-ALFONZO, J.; VIVESVARA, G. 1994. Granulomatous amebic encephalitis: a review and report of spontaneous case from Venezuela. *Acta Neuropathol.*, 87:430- 34.
42. MARTINEZ, J. M.; SOTELO-AVILA, C.; ALCALÁ, H.; WILLAERT, E. 1980. Granulomatous encephalitis, intracranial arteritis and mycotic aneurysm due to a free-living amoeba. *Acta Neuropathol.*, 49: 7-12.
43. MICHEL, R.; BORNEFF, M. 1989. The significance of amoebae and other protozoa in water conduit systems in dental units., *Zentralbl Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene*, 187 (4-6): 312-23.
44. MICHEL, R.; BURGHARDT, H.; BERGMANN, H. 1995. *Acanthamoeba*, naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital. *Zentralbl Hygiene Umweltmed.*, 196 (6): 532-44.
45. MICHEL, R.; MENN, T. 1991. *Acanthamoebae, Naegleriae*, and invertebrates isolated from wet areas of physiotherapeutic facilities of hospitals. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.*, 191: 423-37.
46. MOURA, H. 1980. Amebas de vida livre em piscinas – isolamento, identificação, potencial patogênico. Dissertação de mestrado. Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
47. MORLET, N.; DUGUID, G.; RADFORD, C.; MATHESON, M.; DART, J. 1997. Incidence of *Acanthamoeba* keratitis associated with contact lens wear. *Lancet*, 350: 414-16.
48. NAGINGTON, J.; WATSON, P. G.; PLAYFAIR, T. J.; MCGILL, J.; JONES, B. R.; STEELE A. D. 1974. Amoebic infection of the eye. *Lancet* ii:1537-1540.
49. NEFF, R. J.; RAY, S. A.; BENTON, W. F.; WILBORN, M. 1964. Induction of synchronous encystment (differentiation) in *Acanthamoeba* sp. In *Methods in Cell Physiology*. Academic. Press. Inc., New York. 1: 55.
50. NOSÉ, W.; SATO, E.H.; FREITAS, D. 1998. Úlcera de córnea - casos no Brasil. *Arq. Bras. Oftalmol.*; 51: 223-26.

51. OBEID, W. N.; ARAÚJO, R.; VIEIRA, L. A.; MACHADO, M. A. C. 2003. Ceratite bilateral por *Acanthamoeba* – Relato de caso. Arq. Bras. Oftalmol., 66: 876- 80.
52. ODDO, B. 2006. Infecções por amebas de vida livre.: Comentários históricos, taxonomia y nomenclatura, protozoologia y cuadros anátomo-clínicos. Rev. chil. infectol., 23 (3): 200-14.
53. PAGE, F.C. 1967. Re-Definition of the Genus *Acanthamoeba* with Descriptions of Three Species. J. Protozool., 14 (4): 709-724.
54. PUSSARD, M. ; PONS, R. 1977. Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). Protistologica 13: 557-610.
55. PROCA-CIOBANU, M.; LUPASCU, G. H.; PETROVICI, A.; IONESCU, M. D. 1975. Electron microscopic study of a pathogenic *Acanthamoeba castellanii* strain: the presence of bacterial endosymbionts. Int. J. Parasitol. 5: 49-56.
56. QVARNSTROM, Y.; VISVESVARA, G. S.; SRIRAM R.; SILVA, A. J. 2006. Multiplex Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. J. Clin. Microbiol., 44 (10): 3589-95.
57. RADFORD, C. F.; MINASSIAN, D. C.; DART, J. K. G. 2002. *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. British J. Ophthalmol., 86: 536-42
58. REY, L. 1991. Parasitologia. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 24.
59. RINGSTED, J.; JAGER, B. V.; SUK, D.; VISVESVARA, G. S. 1976. Probable *acanthamoeba* meningoencephalitis in a Korean child. J. Clin. Pathol., 66: 723-30.
60. ROHR, U.; WEBER, S.; MICHEL, R.; SELENKA, F.; WILHELM, M. 1998. Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. App. Environ. Microbiol., 64: 1822-24.
61. ROWBOTHAM, T. J. 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. J. Clin. Pathol., 33: 1179-83.
62. RUTHES, A. C. C.; WAHAB, S.; WAHAB, N.; MOREIRA, H.; MOREIRA, L. 2004. Conjuntivite presumível por *Acanthamoeba*. Arq. Bras. Oftalmol., 67 (6): 897-900.
63. SALAZAR, H.C.; MOURA, H.; RAMOS, R.T. 1982. Isolamento de amebas de vida livre a partir de água mineral engarrafada. Rev. Saúde Públ., 16: 5.
64. SCHUSTER, F. L. 2002. Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. Clin. Microbiol. Rev., 15 (3): 342-54.
65. SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Internat. J. parasitol., 34: 1001- 27.
66. SELL, J. J.; RUPP, F. W.; ORRISON, W. W. 1997. Granulomatous amebic encephalitis caused by *Acanthamoeba*. Neuroradiology, 39: 434-36.
67. SILVA, M.A.; ROSA, J. A. 2003. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. Rev. Saúde Públ., 37 (2) : 242-46.
68. SILVA, M.A. 2001. isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de poeira de hospitais da cidade de Presidente Prudente – SP. Dissertação de mestrado. Facul. Ciênc. Farmac. Univ. Est. São Paulo.
69. SINGH, B. N.; DAS, S. R. 1970. Studies of pathogenic and nonpathogenic small free-living amoebae and the bearing of nuclear division on the classification of the order *Amoebida*. Phil. Trans. roy. Soc., 259: 435-76.

70. SINGH, T.; COOGAN, M. M. 2005. Isolation of pathogenic *Legionella* species and *legionella*-laden amoebae in dental unit waterlines. *J. Hosp. Infect.*, 61 (3): 257-62.
71. STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. 2001. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 98: 15245–50.
72. STEHR-GREEN, J. K.; BAILEY, T. M.; VISVESVARA, G. S. 1989. The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. *Am. J. Ophthalmol.*, 107: 331- 336.
73. STOTHARD, D. R.; SCHROEDER-DIEDRICH, J. M.; AWWAD, M. H.; GAST, R. J.; LEDEE, D. R.; RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S.; DEAN, C. L.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. 1998. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J. Euk. Microbiol.* 45: 45–54.
74. STRATFORD, M. P.; GRIFFITH, A. J. 1978. Variations in the properties and morphology of cysts of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Gen. Microbiol.* 108: 33.
75. SUAREZ, R.; ESPINOZA, Y.; VILLANUEVA, C.; RAMOS, J. 2002. Aislamiento de amebas de vida libre del género *Acanthamoeba* a partir de fuentes de agua em la ciudad de Ica. *An. Facul. Med. Univers. Nac. Mayor de San Marcos*, 63 (2): 116-19.
76. THOMAS, V.; HERRERA-RIMANN, K.; BLANC, D. S.; GREUB, G. 2006. Biodiversity of Amoebae and Amoeba-Resisting Bacteria in a Hospital Water Network. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2428-38.
77. TORNO, M. S.; BABAPOUR, R. JR.; GUREVITCH, A.; WITT, M. D. 2000. Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS., *J. Am. Acad. Dermatol.* 42: 351-54.
78. TSVETKOVA, N.; SCHILD. M.; PANAIOTOV, S.; KURDOVA-MINTCHEVA, R.; GOTTSTEIN B.; WALOCHNIK, J.; ASPOCK, H.; LUCAS, M. S.; MULLER, N. 2004. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol. Res.* 92(5):.405-13.
79. TURNER, N. A.; HARRIS, A. D.; LLOYD, D. 2000. Observation Microbial differentiation and changes in susceptibility to antimicrobial agents. *J. Appl. Microbiol.*, 89 (5): 751.
80. VIVESVARA, G. S.; MARTINEZ, A. J.; SCHUSTER, F. L.; LEITCH, G. J.; WALLACE, S.V.; SAWYER, T. K.; ANDERSON, M. 1990. *Leptomyxid* ameba, a new agent of amebic meningoencephalitis in humans and animals. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 2750-56.
81. VISVESVARA, G. S.; SCHUSTER, F.L.; MARTINEZ, A. J. 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N. G., Sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J. Eucaryot. Microbiol.*, 40 (4): 504-14.
82. VISVESVARA, G. S.; STEHR-GREEN, J. 1990. Epidemiology of free-living ameba infection. *J. Protozool.* 37: 25-33.
83. WALOCHNIK, J.; OBWALLER, A.; ASPÖCK, H. 2000. Correlations between Morphological, Molecular Biological, and Physiological Characteristics in Clinical and Nonclinical Isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environm. Microbiol.*, 66 (10): 4408-13.



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o Aluno Marcos Antonio de Souza Crozetta, do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, oferecido pelos Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica, não necessita de autorização deste Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, para a coleta de amostras de poeira de ambientes hospitalares para pesquisa de isolamento e caracterização de amebas de vida livre potencialmente patogênicas, tendo em vista o estudo não estar sendo realizado com pacientes ou profissionais.

Curitiba, 21 de outubro de 2005.

Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em
Seres Humanos do HC/UFPR
PROF. DR. FLAVIO DE QUEIROZ TELLES FILHO
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas / UFPR
CRM N.º 5728 - Mat. 83623

Dec em 26/10/05
11 gente, de acordo
Prof. Dr. Celso Fernando Ribeiro Araújo
Diretor de Corpo Clínico HC/UFPR
CRM 3621 - Matr. 83578

Anexo 2

Meio PYG modificado de Rowbotham (1980)

Reagentes	Quantidades
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,98 g
CaCl ₂	0,06 g
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2 H ₂ O	1,0 g
Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	0,02 g
Na ₂ HPO ₄	0,4 g
KH ₂ PO ₄	0,34g
Glicose	9,0 g
Proteose Peptona	20,0 g
Extrato de levedo	2,0 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000mL

Preparo: Dissolver os sais um a um, na ordem especificada na tabela. Ajustar o pH em 6,5, completar o volume e autoclavar 20 minutos.

Anexo 3

Meio de Neff (1964) modificado, para encistamento de *Acanthamoeba*

Reagentes	Molaridade
KCl	0,1M
Tris amina	0,02 M
MgSO ₄	0,008 M
CaCl ₂	0,0004 M
NaHCO ₃	0,0001 M
H ₂ O destilada q.s.p.	

Dissolver os sais e ajustar o pH para 8,9-9,0. Autoclavar.