

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

**INTERAÇÃO ENTRE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA
(MRSA) E *Acanthamoeba polyphaga***

THAMIRES KLEIN DE SOUZA

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

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

Porto Alegre

Março/2016

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

**INTERAÇÃO ENTRE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA
(MRSA) E *Acanthamoeba polyphaga***

Thamires Klein de Souza
Bióloga - UNISC

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

Área de concentração: Microbiologia
Ambiental

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

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Março/2016

CIP - Catalogação na Publicação

Klein de Souza, Thamires

Interação entre *Staphylococcus aureus* resistente à
metecilina (MRSA) e *Acanthamoeba polyphaga* /

Thamires Klein de Souza. -- 2016.

58 f.

Orientadora: Marilise Brittes Rott.

Coorientadora: Lisianne Brittes Benitez.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. *Acanthamoeba polyphaga*. 2. *Staphylococcus
aureus*. 3. Cocultivo. 4. Interação. I. Brittes Rott,
Marilise, orient. II. Brittes Benitez, Lisianne,
coorient. III. Título.

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

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Sirlei Maria Klein Souza e Luiz Carlos Reali de Souza, pelo amor incondicional, incentivo em meus sonhos e objetivos e por acreditarem em meu potencial: obrigada por tudo, eu amo vocês!

A minha irmã, meu porto seguro, alma gêmea e melhor amiga, obrigada por estar comigo e apoiar-me em todas as etapas da minha vida. Te amo mana!

A minha família, pela força nos momentos difíceis, incentivo e compreensão. Com certeza minha saudade foi amenizada nesses dois anos de pós-graduação, pois sabia que estavam torcendo por mim!

A minha orientadora, Marilise Brittes Rott, pelo carinho, confiança, ensinamentos durante todo o mestrado, amizade e por apostar em meu trabalho. Muito obrigada por tudo!

A minha coorientadora Lisianne Brittes Benitez, pelo incentivo e amizade durante a graduação, por teres me despertado o amor e entusiasmo pela Microbiologia. Serei eternamente grata!

A minha dupla inseparável, Laura Fühlich Fabres e Scheila Soares de Oliveira, agradeço pela amizade, pelo apoio em todos os experimentos, pela parceria e irmandade. Vocês duas são meus anjos que me guiaram e estiveram presentes em todos os momentos. Obrigada por tudo, amo muito vocês!

Aos amigos, colegas da turma 2014/1, professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, obrigada pela oportunidade, convivência e conhecimento adquirido.

Ao amigo Joel Henrique Ellwanger, agradeço pela amizade, disponibilidade e ajuda na realização das análises estatísticas do presente estudo.

Aos professores da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC agradeço pela base e formação acadêmica. Graças a vocês, realizo o sonho de tornar-me mestre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

INTERAÇÃO ENTRE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA (MRSA) E *Acanthamoeba polyphaga*¹

Autor: Thamires Klein de Souza

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

Co-orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Lisianne Brittes Benitez

RESUMO

As interações que ocorrem entre as bactérias e amebas podem dar-se através de relações mútuas, onde ambos os organismos se beneficiam da associação ou parasitárias, em que um organismo se beneficia em detrimento do outro. Quando esses organismos compartilham o mesmo ambiente, pode resultar em algumas alterações, seja no crescimento dos organismos, nos padrões de adaptação, na morfologia, no seu desenvolvimento ou até mesmo na sua capacidade para sintetizar proteínas e outras substâncias. No presente estudo, avaliou-se a interação entre *Acanthamoeba polyphaga* e *Staphylococcus aureus* (MRSA) através de um modelo de cocultivo em diferentes tempos de incubação. A partir deste, 89% das células amebianas permaneceram viáveis após contato com a bactéria. O isolado bacteriano foi visualizado no interior da ameba através de microscopia confocal e de fluorescência em até 216 horas de cocultivo, sendo considerado um microrganismo resistente à ameba. O contato de *A. polyphaga* com *S. aureus* (MRSA) não demonstrou alteração fenotípica da ameba através dos testes fisiológicos de osmo e termotolerância. O lisado da cultura amebiana aumentou o crescimento de *S. aureus* (MRSA) nos diferentes tempos de incubação, porém houve diferença significativa apenas entre o controle e 96 horas de cocultivo. O crescimento de *S. aureus* (MRSA) foi inibido ao longo dos tempos de incubação pelo efeito do sobrenadante da cultura amebiana apresentando diferença significativa entre o controle e 96 horas de cocultivo, sugerindo-se que *A. polyphaga* tenha secretado algum tipo de metabólito, que inibiu o crescimento da bactéria. A interação dos microrganismos não apresentou alterações significativas no perfil de susceptibilidade aos antibióticos testados. *S. aureus* (MRSA) permaneceu viável em cistos de *A. polyphaga*, reforçando a hipótese de que *Acanthamoeba* pode desempenhar um papel crucial na propagação de *S. aureus* (MRSA) na comunidade e ambiente hospitalar. O maior percentual de amebas encistadas deu-se em 96 horas de incubação quando cocultivadas com o isolado de *S. aureus* (MRSA), apresentando um aumento progressivo deste percentual a cada período de incubação. A partir disso, estudos devem intensificar-se para melhor compreender os mecanismos de virulência envolvidos na interação entre ambos os microrganismos.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (58 p.) Março, 2016.

INTERACTION BETWEEN METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Acanthamoeba polyphaga*¹

Author: Thamires Klein de Souza

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

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

ABSTRACT

The interactions that occur between bacteria and amoebae can give through mutual relations, where both organisms benefit from the association or parasitic in which one organism benefits at the expense of the other. When these organisms share the same environment, can result in some changes in the growth of organisms, in adaptation patterns, in morphology, development or even in their ability to synthesize proteins and other substances. In the present study, we evaluated the interaction between *Acanthamoeba polyphaga* and *Staphylococcus aureus* (MRSA) using a coculture model at different incubation times. From this, 89% of amoebic cells remain viable after contact with the bacteria. The bacterial isolate was visualized inside the amoeba through confocal microscopy and fluorescence for up to 216 hours of cocultivation, being considered a resistant microorganism to the amoeba. The contact of *A. polyphaga* with *S. aureus* (MRSA) showed no phenotypic changes of amoeba through physiologic osmo or thermotolerance tests. The lysate of amoebic culture increased the growth of *S. aureus* (MRSA) in the different incubation times, but there was a significant difference only between the control and 96 hours of cocultivation. The growth of *S. aureus* (MRSA) has been inhibited over the incubation times for the effect of amoebic culture supernatant showing a significant difference between the control and 96 hours of coculture, suggesting that *A. polyphaga* has some kind of secreted metabolites inhibiting the growth of bacteria. The interaction of microorganisms showed no significant changes in the susceptibility profile of the tested antibiotics. *S. aureus* (MRSA) remained viable cysts of *A. polyphaga*, reinforcing the hypothesis that *Acanthamoeba* can play a crucial role in the spread of *S. aureus* (MRSA) in the community and hospital. The highest percentage of encysted amoebae occurred in 96 hours of incubation when cocultured with the isolate of *S. aureus* (MRSA), with a progressive increase in this percentage to each incubation period. From this, studies should be intensified to better understand the virulence mechanisms involved in the interaction between these two organisms.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (58 p.) March, 2016.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. OBJETIVOS..... | 15 |
| 2.1 Objetivo Geral | 15 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 15 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 15 |
| 3.1 Histórico | 16 |
| 3.2 O gênero <i>Acanthamoeba</i> | 17 |
| 3.3 Infecções causadas por <i>Acanthamoeba</i> spp..... | 19 |
| 3.3.1 Ceratite por <i>Acanthamoeba</i> | 19 |
| 3.3.2 Encefalite amebiana granulomatosa (EAG) | 21 |
| 3.4 Interação entre <i>Acanthamoeba</i> spp. e bactérias | 22 |
| 3.5 Mecanismos de patogenicidade em <i>Acanthamoeba</i> | 23 |
| 3.6 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) | 23 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 27 |
| 4.1 Condições de crescimento de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> | 27 |
| 4.2 Condições de crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)..... | 27 |
| 4.3 Cocultivo entre <i>Acanthamoeba polyphaga</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ... | 27 |
| 4.4 Viabilidade amebiana após cocultivo | 28 |
| 4.5 Viabilidade bacteriana após cocultivo | 28 |
| 4.6 Estudo da patogenicidade de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> utilizando testes de tolerância..... | 28 |
| 4.6.1 Osmotolerância | 29 |
| 4.6.2 Termotolerância | 29 |
| 4.7 Efeito do sobrenadante da cultura e do lisado amebiano sobre o crescimento bacteriano..... | 29 |
| 4.8 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) após cocultivo..... | 30 |
| 4.9 Presença intracelular de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) em <i>Acanthamoeba polyphaga</i> | 31 |
| 4.9.1 Microscopia de Fluorescência | 31 |
| 4.9.2 Microscopia Confocal | 31 |
| 4.10 Influência de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) no processo de encistamento de | |

| | |
|--|-----------|
| <i>Acanthamoeba polyphaga</i> | 32 |
| 4.11 Análise estatística | 20 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 22 |
| 5.1 Viabilidade amebiana após cocultivo | 22 |
| 5.2 Viabilidade bacteriana após cocultivo | 23 |
| 5.3 Estudo da patogenicidade de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> utilizando testes de tolerância | 25 |
| 5.4 Efeito do sobrenadante da cultura e do lisado amebiano sobre o crescimento bacteriano | 27 |
| 5.5 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) após cocultivo | 29 |
| 5.6 Presença intracelular de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) em <i>Acanthamoeba polyphaga</i> | 33 |
| 5.7 Influência de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) no processo de encistamento de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> | 41 |
| 6. CONCLUSÃO | 45 |
| PERSPECTIVAS | 54 |
| 7. REFERÊNCIAS | 57 |
| 8. ANEXOS | 59 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Formas de vida de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> e suas características morfológicas. | 6 |
| Figura 2: Divisão celular de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> por fissão binária. | 6 |
| Figura 3: Olho infectado por <i>Acanthamoeba</i> | 7 |
| Figura 4: Fatores de risco que contribuem para a ceratite amebiana. | 8 |
| Figura 5: Cultivo de 24 horas do isolado resistente à metilina (MRSA) em Ágar Baird Parker | 13 |
| Figura 6: Viabilidade de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> em cocultivo com <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) em função do tempo. | 22 |
| Figura 7: Viabilidade de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) em cocultivo com <i>Acanthamoeba polyphaga</i> | 24 |
| Figura 8: Efeito do sobrenadante da cultura e do lisado amebiano sobre o crescimento bacteriano. | 29 |
| Figura 9: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos testados frente a <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) após diferentes tempos de cocultivo com <i>Acanthamoeba polyphaga</i> | 31 |
| Figura 10: Microscopia de fluorescência de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) internalizados em trofozoítos de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> após 24 horas de cocultivo. | 34 |
| Figura 11: Microscopia de fluorescência de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) internalizados em trofozoítos de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> após 48 horas de cocultivo. | 34 |
| Figura 12: Microscopia de fluorescência de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) internalizados em trofozoítos de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> após 72 horas de cocultivo. | 34 |
| Figura 13: Microscopia de fluorescência de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) internalizados em trofozoítos de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> após 96 horas de cocultivo. | 35 |
| Figura 14: Microscopia de fluorescência de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) internalizados em <i>Acanthamoeba polyphaga</i> (forma cística) após 192 horas de cocultivo. | 35 |
| Figura 15: Microscopia confocal de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) internalizados | |

| | |
|--|----|
| em trofozoítos de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> após 24 horas de cocultivo. | 35 |
| Figura 16: Microscopia confocal de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) internalizados em trofozoítos de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> após 48 horas de cocultivo. | 36 |
| Figura 17: Microscopia confocal de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) internalizados em <i>Acanthamoeba polyphaga</i> (forma cística) após 72 horas de cocultivo. | 36 |
| Figura 18: Microscopia confocal de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) internalizados em <i>Acanthamoeba polyphaga</i> (forma cística) após 96 horas de cocultivo. | 36 |
| Figura 19: Microscopia confocal de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) internalizados em <i>Acanthamoeba polyphaga</i> (forma cística) após 216 horas de cocultivo. | 37 |
| Figura 20: Microscopia confocal de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) internalizados em trofozoítos de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> após 24 horas de cocultivo. | 37 |
| Figura 21: Microscopia confocal de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) internalizados em trofozoítos de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> após 48 horas de cocultivo. | 37 |
| Figura 22: Microscopia confocal de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) internalizados em trofozoítos de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> após 72 horas de cocultivo. | 38 |
| Figura 23: Microscopia confocal de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) internalizados em trofozoítos de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> após 96 horas de cocultivo. | 38 |
| Figura 24: Microscopia confocal de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) internalizados em trofozoítos de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> após 216 horas de cocultivo. | 38 |
| Figura 25: Influência de <i>S. aureus</i> (MRSA) no processo de encistamento de <i>A. polyphaga</i> | 42 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1: Diferenciação da patogenicidade de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> através de testes de tolerância..... | 26 |
| Quadro 2: Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos frente a <i>S. aureus</i> (MRSA) em cocultivo com <i>A. polyphaga</i> | 30 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------|--|
| µm | Micrômetro |
| µM | Micromolar |
| µL | Microlitro |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| AVL | Amebas de Vida Livre |
| BP | Ágar Baird-Parker |
| DAPI | 4'6'-diamidino-2-fenilindol |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| EAG | Encefalite Amebiana Granulomatosa |
| HCE | Células Epiteliais de Córnea Humana |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| M | Manitol |
| MBP | Proteína Ligante à Manose (do inglês: <i>Mannose binding protein</i>) |
| MH | Ágar Mueller-Hinton |
| MRSA | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina |
| mL | Mililitro |
| PBS | Tampão Fosfato Salino |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |

1. INTRODUÇÃO

Amebas de vida livre (AVL) pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* encontram-se amplamente distribuídas no solo, na água e no ar, sendo conhecidas como amebas anfitriônicas, devido a sua capacidade de sobreviver tanto em um hospedeiro como no ambiente, ocupando um nicho próprio no campo da parasitologia.

Ao longo dos anos, amebas de vida livre ganharam cada vez mais atenção da comunidade científica devido aos seus diversos papéis no ecossistema e por causarem sérias infecções em humanos, dentre elas, a ceratite amebiana, infecção crônica da córnea, mais frequente em usuários de lentes de contato causada por espécies de *Acanthamoeba* como *Acanthamoeba polyphaga*.

Acanthamoeba alimenta-se ativamente de diversos organismos, porém alguns deles evoluíram tornando-se resistentes aos protistas, uma vez que não são internalizados ou são capazes de sobreviver, crescer e sair das amebas após internalização. É sugerido que essas interações podem ajudar a transmitir os microrganismos a hospedeiros suscetíveis e/ ou contribuir para a patogenicidade destes.

Interações entre o gênero *Acanthamoeba* e bactérias podem resultar em um estado endossimbiótico ou ainda levar à destruição de um dos associados ou ambos. As amebas são consideradas predadoras de bactérias e atuam controlando a sua população no solo e em ambientes aquáticos. Além disso, já foram relatadas interações entre algumas bactérias patogênicas e amebas de vida livre, entre elas, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA).

Dentro do gênero *Staphylococcus*, o *S. aureus* sempre foi a espécie mais importante vinculada a uma série de infecções e intoxicações no ser humano e nos animais, sendo considerada, portanto, a espécie de maior interesse médico, principalmente em ambiente nosocomial. Os estafilococos são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, imóveis que apresentam metabolismo fermentativo com produção de ácido e sem gás, não esporogênicos, não fotossintéticos, catalase-positivos e capazes de crescer em meio contendo 10% de cloreto de sódio.

S. aureus apresenta uma grande resistência a antimicrobianos de amplo espectro de ação, como por exemplo, a meticilina, que determina o surgimento de cepas resistentes, conhecidas como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

(MRSA).

Considerando que esses microrganismos coexistem em diversos ambientes naturais e artificiais, é possível assumir que eles apresentem algum tipo de interação. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo investigar a interação entre *Acanthamoeba polyphaga* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e suas implicações em fatores intrínsecos de ambos os organismos, bem como avaliar as possíveis consequências em ceratite.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a interação entre *Acanthamoeba polyphaga* e *Staphylococcus aureus* (MRSA) através de um modelo de cocultivo.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Estudar a internalização da bactéria *Staphylococcus aureus* (MRSA) por *Acanthamoeba polyphaga* através do cocultivo em diferentes tempos e temperaturas de incubação.

2.2.2 Verificar a viabilidade celular das cepas de *Acanthamoeba polyphaga* e *Staphylococcus aureus* (MRSA) após o cocultivo.

2.2.3 Avaliar a alteração fenotípica da ameba através dos métodos de termo e osmotolerância após o cocultivo.

2.2.4 Testar o efeito do sobrenadante do cultivo e do lisado amebianos sobre o crescimento bacteriano.

2.2.5 Avaliar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* (MRSA) após cocultivo.

2.2.6 Avaliar a influência de *Staphylococcus aureus* (MRSA) no processo de encistamento de *Acanthamoeba polyphaga*.

2.2.7 Visualizar a internalização de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) em *Acanthamoeba polyphaga* através de Microscopia Confocal e Microscopia de Fluorescência.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Histórico

O interesse médico e epidemiológico nas AVL começou quando Culbertson et al. (1958), observaram durante a produção de vacinas para a poliomielite, o desenvolvimento de placas de algum organismo contaminante nas placas de cultivo celular. O fluido dessas placas contaminadas quando inoculado em ratos e macacos levava-os à morte por encefalite. Nesses cultivos foram posteriormente isolados trofozoítos e cistos de amebas pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* (Marciano Cabral e Cabral, 2003).

Nagington et al. (1974) 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. Jones et al. (1975) descreveram um caso de ceratite provocada por *A. castellanii*, 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*.

Martinez et al. (1977), relataram a provável porta de entrada de AVL no organismo humano pela via olfativa e associaram a infecção a indivíduos imunologicamente debilitados ou que tivessem recente histórico de terem nadado 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 causados pelo gênero *Naegleria*. Foronda, em 1979, 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 líquido 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).

3.2 O gênero *Acanthamoeba*

O gênero *Acanthamoeba* pertence ao filo Sarcomastigophora e sub-filo Sarcodina, o qual compõe o grupo de amebas de vida livre (AVL) potencialmente patogênicas juntamente com *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* e *Sappinia pedata* (Marciano-Cabral e Cabral, 2003).

São protozoários com característica ubiqüitária e anfitriônica, sendo amplamente distribuídos no ambiente (Siddiqui e Khan, 2012), sendo isolados de diversos locais tais como, ambiente hospitalar (Carlesso et al. 2010), água de piscina (Caumo et al. 2009), estojos de lentes de contato (Pens et al. 2008), lentes de contato (Marciano-Cabral e Cabral, 2003) e outros.

Nas últimas décadas, as amebas de vida livre ganharam uma crescente atenção devido aos seus diversos papéis no ecossistema e por causarem sérias infecções em humanos, por vezes fatais (Khan, 2006; Siddiqui e Khan, 2012a).

Castellani descreveu *Acanthamoeba* pela primeira vez em 1930, como um contaminante da cultura de *Cryptococcus pararoseus*. Porém, o gênero foi descrito como o agente etiológico da encefalite granulomatosa e ceratite por *Acanthamoeba* nas décadas de 1960 e 1970, respectivamente (Siddiqui e Khan, 2012a).

Acanthamoeba spp. apresentam em seu ciclo de vida duas formas morfológicas distintas (Figura 1): o trofozoíto, conhecido como a forma vegetativa, presente em condições favoráveis e capaz de reproduzir-se por fissão binária (Figura 2), caracterizado pela presença de um único núcleo e finos acantopódios que se projetam para fora da célula e permitem adesão a superfícies, movimentos celulares e captura de presas (Khan, 2006).

A outra forma morfológica é o cisto, também conhecido como forma de resistência desses organismos, presente em condições desfavoráveis como deficiência nutricional, dessecação, alterações no pH e temperatura. É uma estrutura uninucleada com uma dupla parede (ectocisto, a parede externa e endocisto, a parede interna) (Visvesvara et al. 2007).

Os cistos apresentam poros, chamados de ostíolos, que são utilizados para monitorar as mudanças ambientais. Com o retorno de condições adequadas, ocorre

o desencistamento e a liberação dos trofozoítos proliferativos (Trabelsi et al. 2012).

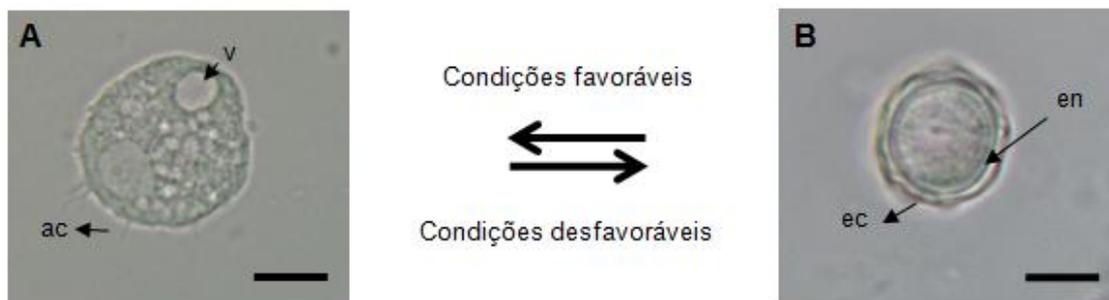


Figura 1: Formas de vida de *Acanthamoeba polyphaga* e suas características morfológicas. (A) Trofozoíto com acantapódios (ac) e vacúolos (v). (B) Cisto de forma arredondada com endocisto (en) e ectocisto (ec). Barra = 10 μ m.

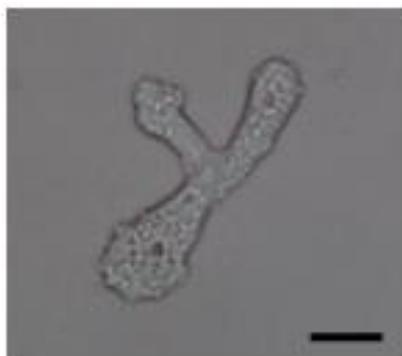


Figura 2: Divisão celular de *Acanthamoeba polyphaga* por fissão binária. Barra = 10 μ m.

Além disso, Mazur et al. (1995) demonstraram que a viabilidade dos cistos de *Acanthamoeba* em ambientes naturais, bem como em laboratório, armazenados em água a 4°C, é de aproximadamente 25 anos. Cistos de *Acanthamoeba* spp. causadoras de ceratite têm sobrevivido em torno de 14 a 90 dias em soluções oftalmológicas, incluindo desinfetantes usados para limpeza de lentes (Brandt et al. 1989). Entretanto, o potencial de encistamento pode ser perdido após a transferência de *Acanthamoeba* para culturas axênicas em um período curto de cultivo (Koesler et al. 2008). *Acanthamoeba* toleram uma ampla variação de condições tais como osmolaridade, temperatura, salinidade e pH, o que lhe permite sobreviver em água destilada, cultura de tecidos e fluidos corpóreos de mamífero e ainda sobreviver a 37°C e a altas temperaturas corpóreas.

Devido a estas características, algumas espécies de *Acanthamoeba* tais como, *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba culbertsoni*, *Acanthamoeba hatchetti*, *Acanthamoeba healyi*, *Acanthamoeba astronyxix*, *Acanthamoeba divionensis* e *Acanthamoeba polyphaga*, podem provocar infecções em humanos (Schuster e Visvesvara, 2004; Trabelsi et al. 2012).

3.3 Infecções causadas por *Acanthamoeba* spp.

Acanthamoeba spp. pode causar um amplo espectro de infecções que irão depender do seu contato com hospedeiro assim como do *status* imunológico do mesmo. As mais importantes infecções causadas por *Acanthamoeba* são a encefalite amebiana granulomatosa (EAG), e uma ceratite dolorosa que pode levar à cegueira.

3.3.1 Ceratite por *Acanthamoeba*

A ceratite acantamebiana é uma infecção não-oportunista causada por *Acanthamoeba* spp. (Figura 3). É uma infecção aguda da córnea, de progressão rápida e extremamente dolorosa, podendo resultar em diminuição da acuidade visual e cegueira (Illingworth e Cook, 1998).



Figura 3: Olho infectado por *Acanthamoeba*.
Fonte: Khan, 2006.

O uso inadequado de lentes de contato é o principal fator de risco à infecção ocular causada por *Acanthamoeba*, independente do estado imunológico do indivíduo (Awwad et al. 2007). Desde sua descrição em 1974, a incidência de

ceratite amebiana vem aumentando face à popularização do uso de lentes de contato (Illingworth e Cook, 1998). Entretanto, outras formas de contaminação podem conduzir a esta patologia (Figura 4).

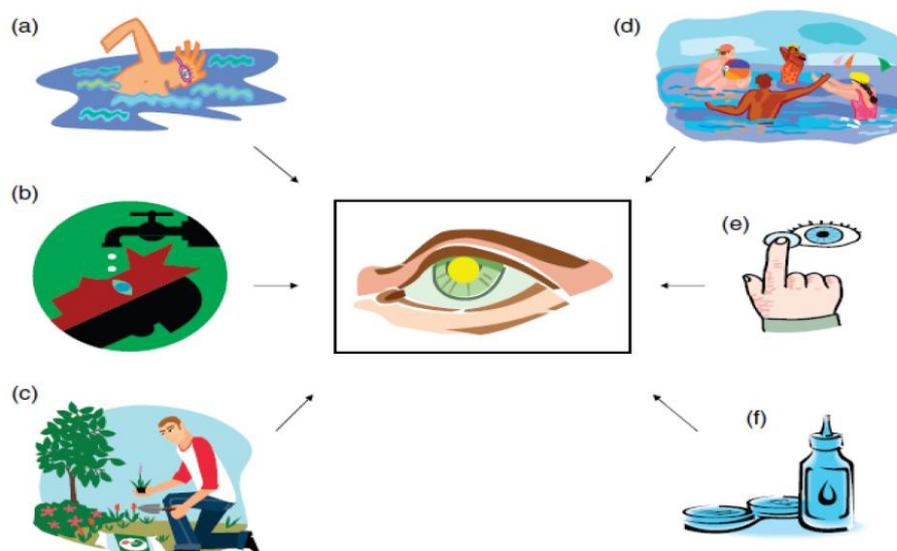


Figura 4: Fatores de risco que contribuem para a ceratite amebiana: (a) natação, especialmente usando lentes de contato; (b) lavar os olhos com água de torneira usando lentes de contato; (c) trabalhar com o solo sem proteção ocular; (d) exercer atividades relacionadas à água (em piscinas ou praias); (e) manipular lentes de contato com as mãos sujas; (f) usar solução salina caseira para a limpeza e conservação das lentes de contato. Fonte: modificado de Khan, 2006.

Até o presente momento existem poucos dados epidemiológicos sobre a incidência de ceratite amebiana no Brasil. Mesmo assim, é importante salientar que cerca de 10 a 15% dos casos são observados em indivíduos não usuários de lentes de contato os quais apresentaram sintomatologia e patologia similar àquelas infecções presentes em usuários de lentes de contato (Illingworth e Cook, 1998).

A infecção decorre da capacidade do protozoário habitar de maneira cosmopolita a água doce e de sobreviver em estojos e soluções salinas de limpeza de lentes de contato (Ahearn e Gabriel, 1997; Kumar e Lloyd, 2002), que não são amebicidas e propiciam crescimento amebiano. Além disso, tem sido mostrado que a presença de limo nas pias de banheiros e cozinhas é um relevante fator de adaptação ambiental de *Acanthamoeba* (Seal et al. 1992). Após a instalação do protozoário nos estojos de lentes de contato, *Acanthamoeba* é capaz de aderir à superfície das lentes, a qual entrará em contato com a córnea, causando um leve trauma que, por sua vez, permitirá que as amebas associem-se ao epitélio córneo e

comecem o processo infeccioso (Willcox e Holden, 2001; Kumar e Lloyd, 2002).

Clinicamente, os sintomas da ceratite amebiana estão ligados à invasão e à degradação dos componentes da córnea. O tempo de incubação é de cerca de 10 a 15 dias antes do aparecimento dos sinais. Observa-se claramente, na maioria dos casos, uma sequência de sintomas: vermelhidão nos olhos que lacrimejam mais que o normal, fotofobia e edema, geralmente afetando apenas um olho (Illingworth e Cook, 1998; Marciano-Cabral e Cabral, 2003). A dor relatada é geralmente muito intensa não diretamente relacionada com o quadro clínico visual. Patologicamente, é possível inicialmente observar-se amebas restritas na região anterior do epitélio da córnea, as quais progressivamente avançam em direção ao estroma, causando dano, opacidade e inflamação (Marciano-Cabral e Cabral, 2003; Clarke e Niederkorn, 2006).

O diagnóstico adequado da ceratite amebiana pode ser feito através da análise das lentes de contato e/ou de seus estojos, ou a partir de biópsias da córnea infectada, adicionando-as a meio de cultura apropriados para o isolamento e crescimento de *Acanthamoeba* (Schuster, 2002). A técnica mais conhecida de isolamento de amebas a partir de amostras ambientais ou clínicas é a da migração em ágar semi-sólido contendo bactérias, desenvolvida por Neff (1958).

Geralmente anti-inflamatórios como dexametasona são evitados, pois estimulam a proliferação de *Acanthamoeba in vitro* (McClellan et al. 2001). A terapia é longa, pois além de matar as amebas, suas formas de resistência (cistos) também devem ser eliminadas e a melhor maneira de eliminá-los é permitindo que transformem-se em trofozoítos, para os quais as drogas são mais eficientes. Para um tratamento eficaz de infecções causadas por *Acanthamoeba*, recomenda-se o uso de clorexidina ou ainda, a combinação de biocidas como PHMB-clorexidina e PHMB-fluconazol (Kumar e Lloyd, 2002).

3.3.2 Encefalite amebiana granulomatosa (EAG)

É uma infecção que acomete o sistema nervoso central de indivíduos imunodeprimidos. A invasão pode ocorrer pela pele (ulcerações) ou pelo trato respiratório (neuroepitélio), seguindo então por via hematogênica até o sistema nervoso central (Martinez e Visvesvara, 1997).

O nome da doença refere-se à formação de granuloma, devido à presença do protozoário. Os mecanismos associados com a patologia não estão muito claros, mas as complicações patofisiológicas envolvem o sistema nervoso central, onde há a indução de uma resposta pró-inflamatória, a partir da invasão da barreira hematoencefálica e a ligação ao tecido, seguida de lesão neuronal (Khan, 2004; Schuster e Visvesvara, 2004).

A infecção é considerada crônica, podendo levar de semanas a anos para que os sintomas clínicos apareçam. Geralmente, o diagnóstico só é obtido após a necropsia através da análise microscópica das formas trofozoíticas no tecido cerebral, porém, a constatação de altos níveis de anticorpos *Acanthamoeba*-específicos pode ajudar na confirmação da suspeita da infecção. Além dessas análises, métodos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) estão sendo desenvolvidos para agilizar o diagnóstico e o tratamento (Khan, 2003; Schuster e Visvesvara, 2004).

3.4 Interação entre *Acanthamoeba* spp. e bactérias

Amebas do gênero *Acanthamoeba* podem funcionar como reservatórios de várias bactérias patogênicas. *Acanthamoeba* alimenta-se de bactérias do ambiente por fagocitose e algumas dessas podem sobreviver e multiplicar-se no seu interior (Proca-Ciobanu, 1975).

Estudos sobre a interação de *A. polyphaga* e *A. castellanii* com diversas espécies de bactérias mostraram que dois passos são necessários à fagocitose: a ligação à superfície das amebas e posterior internalização (Bottone et al. 1994).

Estas interações são complexas e dependem de características das amebas e das bactérias, onde o resultado pode ser benéfico às amebas, às bactérias ou a ambos (Greub e Raoult, 2004).

Desta forma, é possível observar predação de bactérias por *Acanthamoeba*, bactérias que infectam *Acanthamoeba* (muitas destas com importância em saúde pública) e relações endossimbióticas, favorecendo ambas.

As amebas são consideradas predadoras de bactérias e atuam controlando a sua população no solo e em ambientes aquáticos (Rodriguez-Zaragoza, 1994; Marciano-Cabral e Cabral, 2003). Todavia, muitas espécies de bactérias são internalizadas e posteriormente escapam à via de degradação no interior do

citoplasma, infectando a ameba e levando a sua destruição (Winiiecka-Krusnell e Linder, 2001).

A presença de endossimbiontes pode determinar mudanças na fisiologia das amebas que os carregam, como por exemplo, alterações expressivas de patogenicidade. Além disso, interações temporárias entre bactérias e amebas, onde as bactérias infectam e destroem os hospedeiros amebianos são de extrema relevância, porque muitas das espécies de bactérias que realizam tal mecanismo são patogênicas para humanos (Horn e Wagner, 2004).

3.5 Mecanismos de patogenicidade em *Acanthamoeba*

Patogenicidade é descrito como a capacidade de um organismo causar dano ao hospedeiro. É um evento complexo e multifatorial, onde diversos fatores tanto do hospedeiro quanto do patógeno são relevantes para o sucesso da infecção (Casadevall e Pirofski, 1999; Baarlen et al. 2007).

Acanthamoeba pode ser descrito como patógeno facultativo e eventualmente oportunista (Baarlen et al. 2007), possui um conjunto de mecanismos que juntos podem levar a danos ao hospedeiro. A sequência de eventos observada na ceratite amebiana: adesão na superfície da córnea, destruição e invasão epitelial, extravasamento para o estroma e sua degradação, associada a forte resposta inflamatória (Nieder Korn et al. 1999; Khan, 2003; Clarke e Nieder Korn, 2006) são mediados por diversos mecanismos moleculares.

De maneira similar, a sucessão de eventos que levam à EAG e às outras infecções disseminadas (contato com o neuroepitélio olfativo, invasão para os pulmões, migração à corrente sanguínea, rompimento da barreira hematoencefálica, acesso ao SNC), também envolvem mecanismos especiais (Khan, 2006; Khan, 2007). O estudo destes mecanismos ou determinantes de virulência leva, de certa forma, ao entendimento da etiologia das infecções causadas por *Acanthamoeba*.

3.6 *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae* e possui pelo menos 40 espécies descritas até o momento, sendo a maioria coagulase-negativa

(Garrity e Holt, 2001; Euzéby, 2007).

Os estafilococos são cocos gram-positivos, anaeróbios facultativos, imóveis que apresentam metabolismo fermentativo com produção de ácido e sem gás, não esporogênicos, não fotossintéticos e capazes de crescer em meio contendo 10% de cloreto de sódio. São bactérias mesófilas, com temperatura de desenvolvimento que varia entre 7 e 48°C, sendo a temperatura ótima de 37°C e pH na faixa de 4,0 a 10,0, com ótimo de 6,0 a 7,0. *Staphylococcus aureus* é frequentemente coagulase positivo e agrupam-se em massas irregulares que lembram cachos de uvas (Williams e Wilkins, 1994; Kloos e Bannerman, 1999).

Dentro do gênero *Staphylococcus*, o *S. aureus* é considerado um patógeno oportunista, vinculado a uma gama de infecções e intoxicações no ser humano e nos animais, sendo a espécie de maior interesse médico, principalmente em ambiente nosocomial. Os sintomas e a gravidade das infecções causadas por *S. aureus* se devem a vários fatores de virulência incluindo as hemolisinas *a*, *b*, *g* e *d*, a leucocidina e um grupo de superantígenos tóxicos pirogênicos. A toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1) e as enterotoxinas estafilocócicas (EES), que causam a intoxicação alimentar estafilocócica, formam o grupo de superantígenos (Koneman, 2001; Bannerman, 2003; Cassettari et al. 2005).

Além disso, *S. aureus* é a espécie bacteriana mais comum em infecções ósseas, artrites sépticas e infecções de próteses ósseas. Essas infecções caracterizam-se pela dificuldade de tratamento, que pode incluir intervenções cirúrgicas e longos períodos de antibioticoterapia (Davis, 2005).

Este microrganismo possui vários fatores de virulência que podem contribuir para sua capacidade de produzir doença. Entretanto, essas propriedades e a genotipicidade não são constantes em todas as cepas de *S. aureus*. Os principais fatores de virulência são a cápsula, peptidoglicano, ácidos teicóicos, proteína A, adesinas, hemolisinas, enzimas, toxinas extracelulares e leucocidinas (Koneman et al. 2001).

Atualmente sabe-se que os estafilococos coagulase positivos adquiriram resistência aos seguintes antibióticos: penicilina G, penicilina V, amoxicilina, ampicilina e carbenicilina e também à meticilina, oxacilina e às cefalosporinas de primeira e segunda geração. Várias cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) são resistentes tanto às cefalosporinas quanto ao imipenem. Além disso, comumente os estafilococos resistentes à meticilina e oxacilina também são

resistentes aos macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclinas e cotrimoxazol (Cruvinel et al. 2011).

S. aureus apresenta uma grande variação no grau de sensibilidade a antimicrobianos de amplo espectro de ação, como, por exemplo, *Staphylococcus aureus* intermediário à vancomicina (VISA), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina/oxacilina (MRSA/ORSA). Estudos têm documentado também um aumento de custos associados a infecções por MRSA decorrentes de internação hospitalar prolongada, necessidade de antimicrobianos mais caros e gastos indiretos com medidas de controle da infecção (Rossi e Andreazzi, 2005).

Atualmente, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) (Figura 5) é o principal patógeno nosocomial em infecções hospitalares sendo muitas vezes resistente a vários outros antibióticos, tornando a multirresistência, um grande problema de saúde pública (Silva et al. 2007).



Figura 5: Cultivo de 24 horas do isolado resistente à meticina (MRSA) em Ágar Baird-Parker.

A resistência à meticilina é determinada por um gene cromossômico (*mecA*) da bactéria, o qual codifica modificações no receptor betalactâmico, alterando a produção de uma proteína ligadora de penicilina (PPB2a). A presença da PPB2a faz com que a meticilina e os compostos penicilinase-resistentes tenham baixa afinidade pelo local de ligação na bactéria, a parede celular, e por consequência deixem de ser efetivos. Um estudo realizado em 1996, utilizando cepas analisadas em diferentes continentes, apontou as primeiras evidências da existência de cinco tipos de cassetes cromossomais estafilocócicos relacionados com a resistência à meticilina - SCCmec I, II, III, IV e V (Velázquez-Meza, 2005).

Fatores de risco para colonização por *Staphylococcus aureus* resistentes à

meticilina (MRSA) ou infecção hospitalar incluem a exposição prévia a antibióticos, admissão em unidade de terapia intensiva, cirurgia e exposição a um paciente colonizado por MRSA (Thompson et al. 1982).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

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

4.1 Condições de crescimento de *Acanthamoeba polyphaga*

Os experimentos foram realizados utilizando-se uma cepa de origem clínica de *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC® 30461™) pertencente ao genótipo T4. As amebas foram cultivadas em meio PYG (2% de proteose peptona, 0,2% de extrato de levedo e 1,8% de glicose) suplementado com 200 µL de estreptomicina e penicilina G à temperatura constante de 30°C em garrafas de cultivo celular (25 cm²).

4.2 Condições de crescimento de *Staphylococcus aureus* (MRSA)

O isolado clínico de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), obtido de uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de um hospital regional, foi mantido em microtubos contendo Caldo BHI (Caldo Infusão de Cérebro e Coração) acrescido de glicerol estéril a uma concentração final de 20% e assim congelados para a preservação da linhagem original. Para a realização dos experimentos, o isolado foi cultivado em placa de Petri contendo Ágar Baird Parker (BD Baird-Parker Agar) à temperatura de 37°C durante 24 horas.

4.3 Cocultivo entre *Acanthamoeba polyphaga* e *Staphylococcus aureus* (MRSA)

A suspensão amebiana em PBS 1X contendo 10⁶ células/mL foi adicionada a uma placa de 96 poços que foi incubada a 30°C por 30-60 minutos para permitir a adesão das mesmas antes da adição das bactérias a uma MOI (Multiplicidade de Infecção) de 1:100 de ameba para bactérias. Após este processo, adicionou-se à suspensão amebiana, 100 µL de uma concentração de 10⁸ células/mL de *S. aureus* (MRSA) (0,5 na escala de McFarland), o que corresponde a aproximadamente 1,5 x

10⁸ UFC/mL. O cocultivo foi incubado por 2, 24, 48, 72 e 96 horas a 30°C para realização da avaliação da viabilidade celular. Como controle, as amebas foram cultivadas sozinhas em PBS 1X e o mesmo procedimento foi adotado para o controle do cultivo de *S. aureus* (MRSA).

4.4 Viabilidade amebiana após cocultivo

Para avaliar a viabilidade celular de *A. polyphaga* após cocultivo com *Staphylococcus aureus* (MRSA) foi realizado o ensaio de exclusão com azul de tripano segundo Lamrabet et al. (2012). As células amebianas provenientes do cocultivo dos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas foram lavadas com PBS 1X e alíquotas de 200 µL foram coradas com solução de azul de tripano a 0,4% e contadas em câmara de Fuchs-Rosenthal para avaliação da viabilidade celular. O experimento foi realizado em triplicata, com pelo menos uma repetição. O controle constituiu de trofozoítos de *A. polyphaga* incubados em PBS 1X estéril, nos mesmos períodos de tempo.

4.5 Viabilidade bacteriana após cocultivo

Para avaliar a viabilidade de *Staphylococcus aureus* (MRSA) após o cocultivo, foram realizadas três diluições seriadas para cada amostra em cada período de incubação, que em seguida foram plaqueadas em Ágar Baird-Parker e incubadas a 37°C durante 24 horas para estimar o número de UFC (Unidades Formadoras de Colônias). Como controle, o isolado bacteriano foi mantido em PBS 1X estéril pelos mesmos períodos de tempo. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

4.6 Estudo da patogenicidade de *Acanthamoeba polyphaga* utilizando testes de tolerância

Anteriormente e após o cocultivo, *Acanthamoeba polyphaga* foi submetida a testes de osmotolerância e termotolerância. Estes testes são utilizados como marcadores na diferenciação de isolados patogênicos e não-patogênicos, como descrito por Caumo et al. (2009).

4.6.1 Osmotolerância

Placas com Ágar Page padrão (controle), e placas com Ágar Page acrescido de 0,5 molar e 1,0 molar de manitol, com sobrecamada de *Escherichia coli* foram utilizadas a fim de investigar o efeito da osmolaridade sobre o crescimento de *Acanthamoeba polyphaga*. Realizou-se uma diluição de 10^3 trofozoítos/placa, que foi inoculada no centro de cada placa e estas foram incubadas em estufa a 30°C por dez dias. Após este período, as placas foram examinadas em microscópio óptico (100 x), contando-se cinco campos em um raio de 20 centímetros do ponto da inoculação. Foram contados os números de cistos e trofozoítos presentes em cada placa, sendo expressos na Tabela 1 como “+” (presença de trofozoítos ou cistos) e “-” (ausência de trofozoítos ou cistos).

4.6.2 Termotolerância

Para o ensaio de tolerância à temperatura foram utilizadas placas de Ágar Page com sobrecamada de *Escherichia coli*, inoculando-se na região central destas uma diluição de 10^3 trofozoítos/placa, que em seguida foram incubadas por dez dias a diferentes temperaturas: 30°C, 37°C e 42°C. As placas submetidas à temperatura de 30°C foram utilizadas como controle na avaliação do crescimento de trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga*. Após este período, as placas foram examinadas como descrito anteriormente.

4.7 Efeito do sobrenadante da cultura e do lisado amebiano sobre o crescimento bacteriano

Para a lise das amebas, uma suspensão amebiana (10^6 células/mL) foi incubada durante 1 minuto no gelo e em seguida 1 minuto a 37°C por 3 vezes. A suspensão resultante passou sete vezes por uma seringa com agulha de calibre 27 G para a completa lise dos trofozoítos. O sobrenadante da cultura amebiana foi obtido a partir do cultivo dos trofozoítos (10^6 células/mL) em PBS a 30°C por 72 horas. Após a incubação, o sobrenadante da cultura foi coletado, centrifugado (200 x g por 5 minutos) e filtrado em membrana de 0,22 µm. Após, o lisado e o

sobrenadante da cultura amebiana foram incubados com uma suspensão de 10^8 células/mL de *Staphylococcus aureus* (MRSA) por até 96 horas. O crescimento bacteriano foi avaliado por meio da contagem de UFC a cada período de incubação (24, 48, 72 e 96 horas).

4.8 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* (MRSA) após cocultivo

Para a determinação do perfil de susceptibilidade ou resistência aos antimicrobianos para o isolado de *Staphylococcus aureus* (MRSA) em cocultivo com *Acanthamoeba polyphaga*, foi utilizado o método de difusão em disco (Kirby & Bauer, 1966) conforme descrito por Benitez et al. (2011) para o isolado de *Staphylococcus aureus* (MRSA) em cocultivo com *Acanthamoeba polyphaga*, com algumas modificações.

Primeiramente, o isolado de *Staphylococcus aureus* (MRSA) foi suspenso em Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) e incubado durante 24 horas a 37°C. A seguir, a cultura foi diluída até a concentração de 10^8 células/mL (0,5 da escala de McFarland) e 1 mL foi adicionado a garrafas de cultivo contendo uma suspensão de 10^6 células/mL de *Acanthamoeba polyphaga* sendo incubada em diferentes tempos de 24, 48, 72 e 96 horas.

Após este procedimento, a suspensão do cocultivo de ambos os microrganismos em cada tempo de incubação foi semeada em placas de Ágar Mueller-Hinton (MH). Os antimicrobianos de marca Sensidisc® - DME testados foram cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg) e penicilina (10 un). As placas foram mantidas por uma hora à temperatura ambiente para difusão dos antimicrobianos e posteriormente incubadas a 37°C por 24 horas. Após foram realizadas as leituras dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* (MRSA) e classificou-se como sensível ou resistente aos antimicrobianos, conforme CLSI (2007). Como controle, realizou-se o mesmo procedimento somente com *Staphylococcus aureus* (MRSA), ou seja, sem cocultivo com *Acanthamoeba polyphaga*. O teste foi realizado em triplicata para todos os tempos de incubação.

4.9 Presença intracelular de *Staphylococcus aureus* (MRSA) em *Acanthamoeba polyphaga*

A visualização e comprovação de *Staphylococcus aureus* (MRSA) internalizado em *Acanthamoeba polyphaga* deu-se a partir da realização de Microscopia de Fluorescência e Microscopia Confocal.

4.9.1 Microscopia de Fluorescência

Para realização da microscopia de fluorescência foi utilizado o microscópio de marca Olympus BX41 do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, o qual apresenta lâmpada de mercúrio de 100 W, de marca Olympus U-RFL-T, com conjunto de filtro para DAPI Sigma-Aldrich® (4'6'-diamidino-2- fenilindol) que possui sua máxima absorção no comprimento de onda de 358 nm quando exposto à luz ultravioleta (UV). Quando associado à dupla-fita de DNA do microrganismo, fluorescem intensamente de azul brilhante, tornando-se de fácil visualização.

A suspensão do isolado de *Staphylococcus aureus* (MRSA) foi corada com 100 µL de DAPI por cerca de 30-60 minutos. Após este tempo de contato com o corante, as células foram lavadas com PBS para a retirada do excesso de DAPI e após, adicionou-se trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga* que permaneceram em contato com a suspensão bacteriana corada por 24, 48, 72, 96 e 192 horas.

4.9.2 Microscopia Confocal

Na microscopia confocal foi utilizado o Microscópio Confocal FV1000 do Centro de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CMM – UFRGS), o qual apresenta quatro lasers de fase sólida com excitação que varia de 405-635 nm.

Para a visualização de *Staphylococcus aureus* (MRSA), utilizou-se o corante fluorescente DAPI Sigma-Aldrich® (4'6'-diamidino-2- fenilindol) que possui sua máxima absorção no comprimento de onda de 358 nm quando exposto à luz ultravioleta (UV). Quando associado à dupla-fita de DNA do microrganismo, fluorescem intensamente na tonalidade azul brilhante.

Além deste, foi utilizado o corante fluorescente Cell Tracker™ CM-DIL ($C_{68}H_{105}Cl_2N_3O$) – Thermo Fischer Scientific® contendo 50 µg para reconstituição como requerido pelo fabricante, e que possui máxima absorção no comprimento de onda de 553/570 nm. Este corante foi concebido para passar livremente através das membranas celulares, fluorescendo na tonalidade verde brilhante.

A solução estoque de Cell Tracker™ CM-DIL foi preparada em etanol absoluto (1-2 mg/mL). Após, diluiu-se 1-2 mg/mL da solução estoque em 1 µM \approx 1 µg/mL de Tampão Fosfato Salino (PBS). As células de *Staphylococcus aureus* (MRSA) e *Acanthamoeba polyphaga* (em cocultivo) foram incubadas na solução de trabalho durante 5 minutos a 37°C e após durante 15 minutos a 4°C. A observação das bactérias intracelulares na ameba deu-se a cada intervalo de incubação: 24, 48, 72, 96 e 216 horas.

4.10 Influência de *Staphylococcus aureus* (MRSA) no processo de encistamento de *Acanthamoeba polyphaga*

Trofozoítos (10^6 células/mL) foram semeados em placas de cultivo de 96 poços usando tampão Tris como indutor de encistamento (Koehsler et al. 2008). Após 30 minutos de aclimatação, as amebas foram incubadas com a suspensão de *Staphylococcus aureus* na proporção de 1:1 a 30°C por 96 horas. Como controle, foram incubadas apenas amebas em PBS 1X.

Ao final do tempo de incubação, o número de trofozoítos e cistos foram determinados em câmara de contagem de Fuchs-Rosenthal. Os dados foram expressos como percentagem de encistamento, isto é, o número de cistos em razão do número total de amebas. O experimento foi realizado em triplicata e repetido uma vez.

4.11 Análise estatística

Os dados estão apresentados como mediana e foram analisados considerando 95% de significância ($p < 0.05$) através do teste Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn. Para os resultados obtidos no processo de encistamento de *A. polyphaga* foi utilizado o teste de Friedman seguido de pós-teste de Dunn. As análises estatísticas e os gráficos foram realizados com o programa Graphpad Prism® 5.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Viabilidade amebiana após cocultivo

A fim de verificar a viabilidade amebiana de *Acanthamoeba polyphaga* após cocultivo com *Staphylococcus aureus* (MRSA), utilizou-se o corante vital azul de tripano. O cocultivo foi realizado em PBS 1X e a avaliação realizada a cada período de incubação (2, 24, 48, 72 e 96 horas) onde visualizou-se um decréscimo na viabilidade celular amebiana (Figura 6).

Ao longo do experimento, foi possível verificar no tempo inicial de 2 horas de cocultivo que não houve alteração da viabilidade amebiana. A partir de 24 horas de cocultivo, observou-se um declínio na viabilidade celular amebiana, que foi progressivo até o tempo final de 96 horas, demonstrando aproximadamente 89% de amebas viáveis em cocultivo neste período.

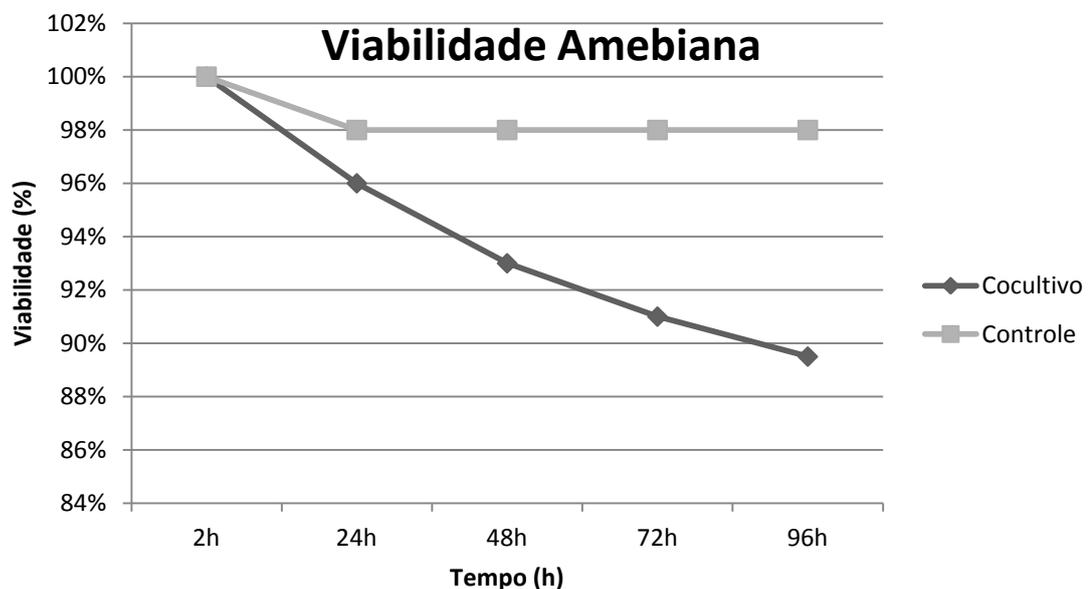


Figura 6: Viabilidade de *Acanthamoeba polyphaga* em cocultivo com *Staphylococcus aureus* (MRSA) ao longo do tempo.

Tem-se reconhecido que as amebas de vida livre podem interagir com uma variedade de microrganismos (especialmente bactérias, mas também fungos e alguns vírus) que podem ser beneficiados pela presença do protozoário (Greub e Raoult, 2004; Khan, 2006). O crescimento e sobrevivência das amebas na presença de bactérias varia com a densidade e espécies de bactérias (Wang e Ahearn, 1997).

Para Bowers e Korn (1969), o aumento da inviabilidade amebiana pode ter ocorrido pelo fato de as amebas começarem a encistar-se devido à escassez de nutrientes apresentando características como: aumento na densidade citoplasmática, expulsão de água das vesículas e redução do volume do nucléolo.

No estudo de Drancourt et al. (2012) também pode-se observar ao longo de cinco dias de cocultivo de *Mycobacterium smegmatis* e *Acanthamoeba polyphaga* que resultou na lise das células de *A. polyphaga* e um aumento significativo do crescimento de *M. smegmatis*. No presente estudo foi possível visualizar o aumento do crescimento de *Staphylococcus aureus* (MRSA) em cocultivo.

Sendo assim, interações entre o gênero *Acanthamoeba* e bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus* (MRSA) podem resultar em um estado de protocooperação ou ainda levar à destruição de um dos associados ou ambos (Marciano-Cabral e Cabral, 2003). No presente estudo, a interação “protozoário-bactéria” inviabilizou apenas 11% das células amebianas, que pode ter sido influenciada pela produção de alguma substância pelo *S. aureus*, prejudicando assim o desenvolvimento de *A. polyphaga*, resultando no decréscimo de sua viabilidade.

5.2 Viabilidade bacteriana após cocultivo

A viabilidade de *Staphylococcus aureus* (MRSA) foi avaliada após o cocultivo com *Acanthamoeba polyphaga*, com o propósito de analisar se o contato dos trofozoítos com a bactéria afetaria a sua viabilidade celular e se haveria influência no seu desenvolvimento.

Este experimento demonstrou viabilidade celular e aumento progressivo do desenvolvimento do isolado bacteriano ao longo dos tempos de cocultivo (24, 48, 72 e 96 horas), sendo quantificado a partir da contagem de UFC/mL e os valores expressos em \log_{10} (Figura 7). Como se pode observar, houve diferença significativa entre o controle de MRSA em comparação a 96 horas de cocultivo ($p < 0.05$).

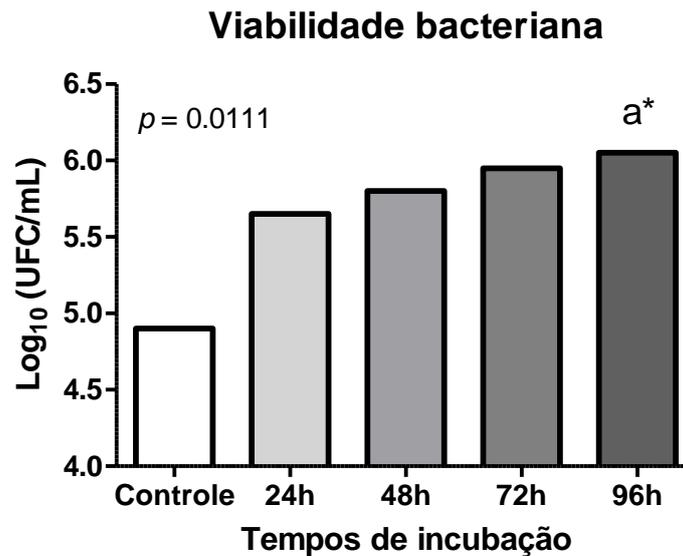


Figura 7: Viabilidade de *Staphylococcus aureus* (MRSA) em cocultivo com *Acanthamoeba polyphaga*. Barras representam a mediana de testes realizados em triplicata. Kruskal-Wallis seguindo de pós-teste de Dunn's. a = em relação a controle. * = $p < 0.05$.

No entanto, diversas bactérias têm apresentado estratégias desenvolvidas para resistir à fagocitose, sobreviver intracelularmente, e multiplicar-se no interior de espécies de *Acanthamoeba*, sendo definidas como bactérias resistentes a amebas - BRA (Greub e Raoult, 2004). Desta forma, supõem-se que estas estratégias tenham sido desenvolvidas pelo isolado de MRSA do presente estudo.

Segundo Fieseler et al. (2014), algumas dessas estratégias têm evoluído durante a coexistência de longo prazo entre bactérias e protozoários. Entre elas estão a formação de células bacterianas alargadas que são difíceis de serem fagocitadas, maior velocidade de motilidade, mascarando e evitando o reconhecimento pelo predador, formação de microcolônia, resistência à fagolisossomas e a sobrevivência intracelular ou mesmo infecção e crescimento.

Exemplos para essas estratégias são representados por numerosas bactérias, por exemplo, *Chlamydia*, *Legionella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Staphylococcus* e *Mycobacterium*, que sobrevivem no interior de protozoários de vida livre e estabelecem uma relação parasitária (Lee et al. 2012; Valeru et al. 2012).

No entanto, a sobrevivência e multiplicação em *Achantamoeba* spp. podem ocorrer devido à capacidade de bactérias, como por exemplo, *Listeria*, *E. coli* e *S. aureus* utilizarem metabólitos secretados por amebas de vida livre para seu benefício (Fieseler et al. 2014).

De acordo com Allen e Dawidowicz (1990), existem outros mecanismos de defesa tais como a produção de toxinas bacterianas, a presença de estruturas de membrana externa de proteção e a redução da acidificação do vacúolo pelas bactérias que podem contribuir para a resistência em células fagocíticas. Ainda, estes autores realizam uma comparação das atividades intracelulares que ocorrem em protozoários após a ingestão de bactérias e mostram que essas são muito semelhantes às atividades observadas em macrófagos.

5.3 Estudo da patogenicidade de *Acanthamoeba polyphaga* utilizando testes de tolerância

O potencial patogênico da cepa de origem clínica de *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC® 30461™) deste estudo foi determinado através de testes de termotolerância e osmotolerância, conforme descrito por Caumo et al. (2009). *A. polyphaga* foi submetida a duas diferentes temperaturas (37°C e 42°C) e duas diferentes concentrações de manitol (0,5 M e 1,0 M), a fim de avaliar seu desenvolvimento anterior e posteriormente ao cocultivo com *Staphylococcus aureus* (MRSA).

No Quadro 1, *A. polyphaga* apresentou desenvolvimento antes e após cocultivo com *S. aureus* (MRSA) na temperatura de 37°C e concentração de 0,5 M, apresentando contagem superior a 30 trofozoítos/campo (média de 5 campos), porém não apresentou crescimento na temperatura de 42°C. Na concentração de 1,0 M de manitol houve o crescimento antes e após cocultivo com *S. aureus* (MRSA), com média de 1 a 15 trofozoítos nas placas submetidas à contagem. Desta forma, *A. polyphaga* apresentou baixo potencial patogênico em ambos os testes de tolerância (Quadro 1).

| | Temperatura de crescimento | | Crescimento em Manitol | | Patogenicidade* |
|--|----------------------------|------|------------------------|-------|----------------------------|
| | 37°C | 42°C | 0,5 M | 1,0 M | |
| Crescimento anterior ao cocultivo | +++ | - | +++ | + | Baixo potencial patogênico |
| Crescimento após o cocultivo | +++ | - | +++ | + | Baixo potencial patogênico |

Quadro 1: Diferenciação da patogenicidade de *Acanthamoeba polyphaga* por testes de tolerância: (-) ausência de *Acanthamoeba polyphaga*, (+) 1 a 15 trofozoítos, (++) 16 a 30 trofozoítos, e (+++) >30 trofozoítos - Média de contagens realizadas em cinco campos microscópicos (1000X). *Critérios estabelecidos por Caumo et al. 2009.

Conforme Khan et al. (2003) isolados patogênicos de *Acanthamoeba* exibem crescimento à temperatura e osmolaridade aumentadas, e sugerem que esses testes fenotípicos podem ser usados na diferenciação e prévia caracterização de isolados clínicos e ambientais correlacionados a testes de efeito citopático.

É importante ressaltar que existem outros fatores além da tolerância à temperatura e resistência ou não às diferentes concentrações molares do meio que podem ser utilizados como critério conclusivo sobre o potencial patogênico de *Acanthamoeba* (De Jonckheere et al. 1977; Stevens et al. 1980; Chan et al. 2011).

Para Khan e Tareen (2003), a variação de crescimento de um isolado em alta concentração osmolar e temperatura podem estar relacionadas com a virulência, dependendo da sua capacidade de adaptação e viabilidade nos tecidos do hospedeiro.

A tolerância à temperatura em torno de 37°C, como ocorreu com a espécie de *Acanthamoeba* do presente estudo, indica que a ameba poderia se desenvolver em temperatura corporal humana. De acordo com Walochnik et al. (2000), para o desenvolvimento de lesão, os organismos precisam, no mínimo, sobreviver à temperatura corporal humana.

Contudo, os mecanismos pelos quais as amebas se adaptam a altas temperaturas e conseguem manter suas atividades metabólicas ainda são pouco conhecidos (Khan, 2003).

Devido à complexidade dos testes que utilizam células de cultura, Khan et al. (2001) propuseram o ensaio de osmotolerância, para ser utilizado em detrimento dos

testes de efeito citopático. Segundo estes autores, somente os isolados denominados “patogênicos” apresentaram capacidade de sobreviver em meio de alta osmolaridade, o que também ocorreu com a espécie deste estudo.

A partir de então a maioria dos estudos envolvendo avaliação de osmotolerância de *Acanthamoeba* tem adotado a osmolaridade de 1,0 M de manitol como limitante para *Acanthamoeba* não patogênica (Walochnik et al. 2000; Khan e Tareen, 2003; Lorenzo-Morales et al. 2005; Carlesso et al. 2010).

No presente estudo, o contato de *A. polyphaga* com o isolado de *S. aureus* (MRSA) não demonstrou alteração fenotípica. Entretanto, ressalta-se que os testes de tolerância realizados não devem ser utilizados como conclusivos para definir a patogenicidade de *A. polyphaga*. Atualmente, diversos ensaios são propostos a fim de determinar a relação entre a patogenicidade de *Acanthamoeba*, tais como: efeito citopático, testes de patogenicidade *in vivo*, secreção de proteases, entre outros.

5.4 Efeito do sobrenadante da cultura e do lisado amebiano sobre o crescimento bacteriano

Com o objetivo de compreender se o crescimento de *Staphylococcus aureus* (MRSA) em cocultura com *Acanthamoeba polyphaga* foi devido à produção de alguma secreção celular, avaliou-se o efeito do sobrenadante da cultura e do lisado amebiano sobre o crescimento bacteriano.

Os resultados demonstraram que o lisado da cultura amebiana promoveu o aumento do crescimento de *S. aureus* (MRSA) nos diferentes tempos de incubação, sendo a quantificação de UFC/mL representada como \log_{10} (Figura 8). Foi observado diferença significativa entre o controle e 96 horas de cocultivo ($p < 0.01$).

Esses resultados sugerem uma multiplicidade de interações entre *A. polyphaga* e *S. aureus* (MRSA), já que a ameba em si pode servir como fonte nutricional e até mesmo, produzir algum fator promotor de crescimento ou nutrientes, que por sua vez, podem ser usados para o crescimento da cultura bacteriana.

Várias substâncias identificadas nas secreções de amebas têm sido relacionadas como possíveis fatores de virulência em *Acanthamoeba* spp., como as enzimas serina e cisteína proteases que têm atividades contra a matriz das proteínas como o colágeno. A serina protease pode ter atividade de proteção para as amebas contra a resposta imune do hospedeiro, atacando e destruindo as

imunoglobulinas do hospedeiro (Morales et al. 2005)

Nas secreções constitutivas de *A. polyphaga*, cepa clínica do presente estudo, detectou-se a presença majoritária de serino-proteases, além de metalo e cisteíno-proteases. Além de proteases, *Acanthamoeba* também expressa e secreta glicosidases, tais como hexaminidases, neuraminidases e celulasas (Anderson et al. 2005).

Douesnard-Malo e Daigle (2011) mostraram em um estudo em que *Salmonella enterica* sorovar Typhi e *A. castellanii* foram cocultivadas em câmaras separadas por uma membrana onde somente era permitido a transferência de nutrientes, mas não associação física. Os autores observaram uma sobrevivência maior da bactéria, do que quando não estava associada a *A. castellanii*. Neste caso, supõe-se que a persistência de bactérias no ambiente pode ser favorecida por amebas, podendo derivar da lise celular dos trofozoítos.

Acredita-se que a coexistência de vários microrganismos que compartilham o mesmo nicho pode afetar seu crescimento, seja nos padrões de adaptação, morfológicos ou até mesmo na capacidade de sintetizar proteínas e metabólitos secundários (Rico-Gray, 2001).

Além disso, o contato dos dois microrganismos pode ter induzido a produção de compostos por *A. polyphaga* desencadeada após a fagocitose de *S. aureus* (MRSA).

Quando testou-se o efeito do sobrenadante da cultura amebiana sobre o crescimento de *S. aureus* (MRSA) verificou-se que houve redução do seu crescimento ao longo dos tempos de incubação, apresentando diferença significativa entre o controle e 96 horas de cocultivo ($p < 0.05$; figura 8).

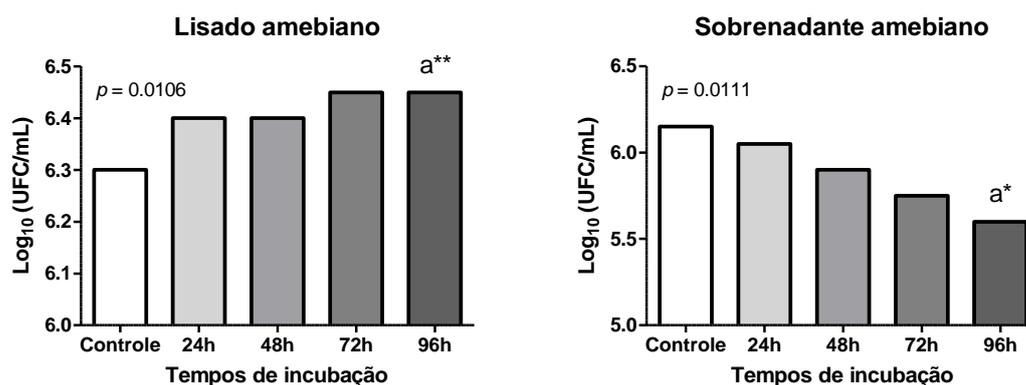


Figura 8: Efeito do sobrenadante da cultura e do lisado amebiano sobre o crescimento bacteriano. Barras representam a mediana de testes realizados em triplicata. Kruskal-Wallis seguindo de pós-teste de Dunn's. a = em relação a controle. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

No estudo de Huws et al. (2008), foi testado o efeito do sobrenadante da cultura de *A. castellanii* sobre o crescimento de *L. monocytogenes* e os resultados indicaram que a bactéria utilizou compostos secretados pela ameba tendo seu crescimento favorecido. Porém, é importante ressaltar que a utilização de substâncias de amebas não é específica para o gênero *Listeria*.

Em um estudo similar, o sobrenadante de *H. vermiformis* propiciou maior sobrevivência de *Candida albicans*, mas não aumentou o seu crescimento. Provavelmente os sobrenadantes continham restos celulares da ameba, que poderiam ser utilizados pelas leveduras como nutriente (Vanessa et al. 2012).

É importante ressaltar que o contrário ocorreu no presente estudo, ou seja, o sobrenadante da cultura amebiana, de alguma forma ainda não esclarecida, interferiu no crescimento do isolado de *S. aureus* (MRSA). Desta forma, supõe-se que pode ter havido a secreção de algum composto pela ameba, que apresentou atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* (MRSA), considerando esta interação vantajosa para a ameba.

5.5 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* (MRSA) após cocultivo

A virulência de organismos internalizados e que se tornam resistentes a *Acanthamoeba* pode ser afetada. Um dos exemplos mais evidentes é a interação *Acanthamoeba* - *Legionella pneumophila*, em que bactérias crescidas no interior da

ameba exibiram um aumento de virulência, motilidade e resistência a biocidas, em comparação ao crescimento bacteriano em meio axênico (Greub e Raoult, 2002).

Dessa forma, um dos objetivos do presente estudo foi avaliar se a interação de *Staphylococcus aureus* (MRSA) com *Acanthamoeba polyphaga* interferiu na susceptibilidade da bactéria a agentes antimicrobianos. A importância deste experimento é devida à múltipla resistência a antimicrobianos que tem sido observada entre isolados de *Staphylococcus aureus*, principalmente entre aqueles responsáveis por infecções nosocomiais.

No Quadro 2 encontram-se os valores dos halos de inibição do crescimento bacteriano, expressos em milímetros (mm) referentes a cada tempo de incubação do cocultivo, classificados como sensível (S), intermediário (I) e resistente (R) aos antibióticos testados de acordo com tabela normatizada pelo CLSI, 2007.

Nota-se que dos seis antibióticos testados, apenas clindamicina apresentou modificação no seu perfil de susceptibilidade após 48 horas de cocultivo com ambos os microrganismos, tornando-se intermediário (I) em relação ao controle.

| ANTIMICROBIANOS TESTADOS | MRSA (CONTROLE) | COCULTIVO 24h | COCULTIVO 48h | COCULTIVO 72h | COCULTIVO 96h |
|--------------------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Cefoxitina | 30,36 (S) | 33,73 (S) | 34,03 (S) | 40,13 (S) | 30,60 (S) |
| Ciprofloxacina | 30,53 (S) | 40,60 (S) | 40,70 (S) | 30,76 (S) | 30,80 (S) |
| Clindamicina | 13,86 (R) | 32,50 (S) | 20,33 (I) | 20,20 (I) | 20,76 (I) |
| Eritromicina | 30,56 (S) | 40,43 (S) | 40,26 (S) | 40,10 (S) | 23,90 (S) |
| Gentamicina | 30,83 (S) | 40,69 (S) | 40,73 (S) | 43,90 (S) | 36,96 (S) |
| Penicilina | 22,20 (R) | 20,27 (R) | 23,90 (R) | 27,03 (R) | 27,06 (R) |

Quadro 2: Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos frente ao *S. aureus* (MRSA) em cocultivo com *A. polyphaga*. Valores dos halos de inibição de cada amostra são expressos em milímetros (mm), onde foram classificados como Sensível (S), Intermediário (I) e Resistente (R) aos antimicrobianos testados de acordo com tabela normatizada (CLSI, 2007).

Na Figura 9 encontra-se ilustrado o perfil de susceptibilidade de cada antibiótico testado, mostrando que não houve diferença significativa quando se compara cada antimicrobiano em todos os tempos de cocultivo.

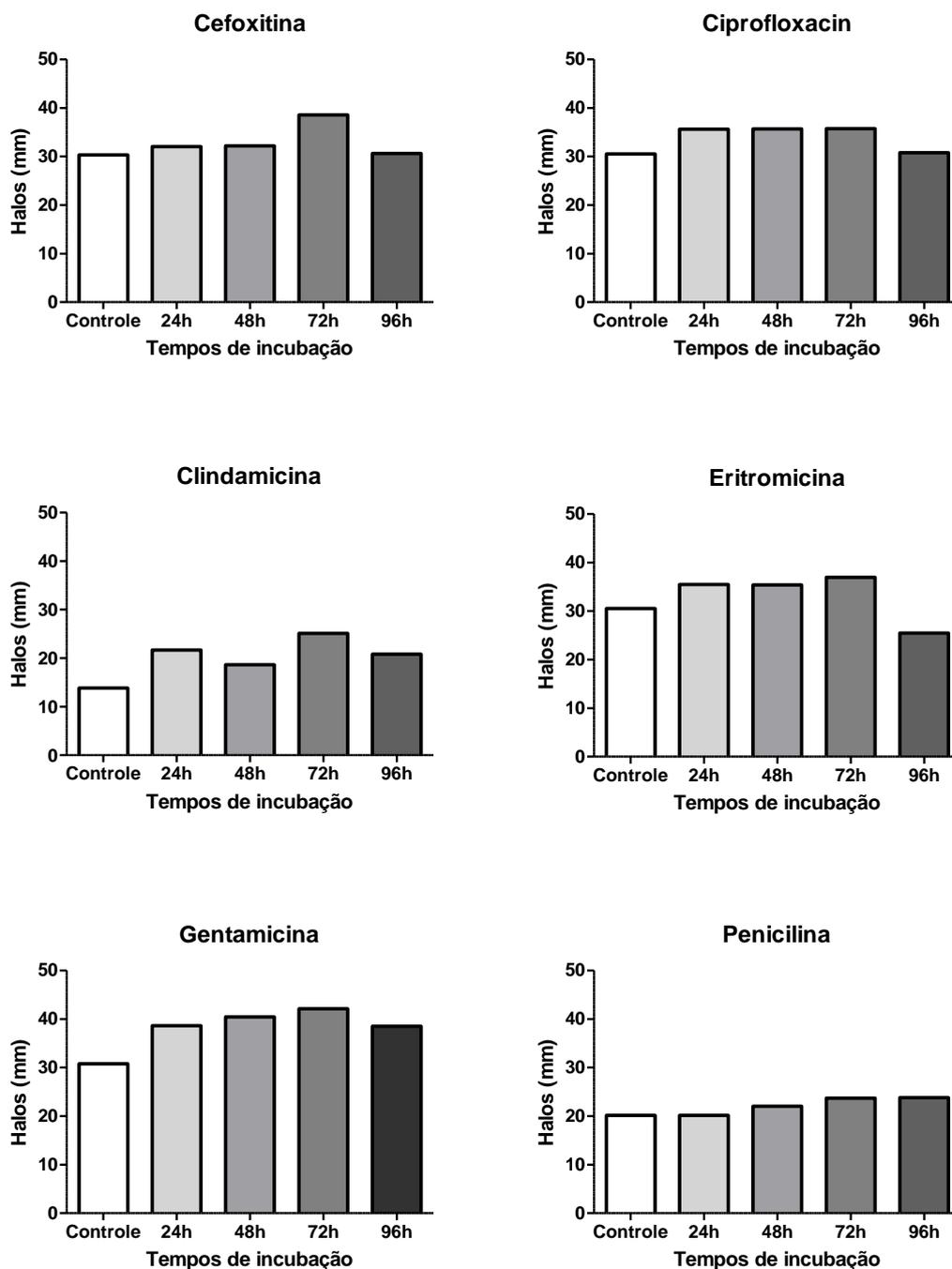


Figura 9: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos testados frente a *Staphylococcus aureus* (MRSA) após diferentes tempos de cocultivo com *Acanthamoeba polyphaga*. Antibiograma avaliado em 24, 48, 72 e 96 horas de cocultivo. Barras representam a mediana de testes realizados em triplicata. Kruskal-Wallis seguindo de pós-teste de Dunn's.

Sabe-se que a patogênese de *S. aureus* é complexa e depende de diversos fatores associados à doença clínica, os quais incluem a virulência do patógeno, resistência antimicrobiana e susceptibilidade do hospedeiro (Felden et al. 2011). Esses fatores incluem a expressão de inúmeras toxinas distintas, proteínas de

adesão da parede celular, enzimas extracelulares e exotoxinas.

Aslam et al. (2006) relataram que o crescimento intracelular das bactérias em *Acanthamoeba* tem sido associado com a melhor sobrevivência ambiental, aumento da virulência e ainda com a diminuição da sensibilidade destes endossimbiontes a substâncias antibióticas. Aqui, a associação dos microrganismos não apresentou alterações significativas no perfil de susceptibilidade aos antibióticos testados.

Obviamente, há uma necessidade definitiva de compreender melhor as interações entre amebas e seus endossimbiontes, bem como a relação de seus fatores de virulência em estudos de susceptibilidade às drogas.

Diante dos resultados expressos acima, pode-se supor que *Acanthamoeba polyphaga* não secretou substâncias que pudessem influenciar o crescimento e consequentemente, a susceptibilidade de *S. aureus* (MRSA) aos antimicrobianos em estudo.

5.6 Presença intracelular de *Staphylococcus aureus* (MRSA) em *Acanthamoeba polyphaga*

A fim de visualizar a presença de *Staphylococcus aureus* (MRSA) em *Acanthamoeba polyphaga* e se este permaneceria viável no interior da célula amebiana em diferentes tempos de cocultivo, foram realizadas a microscopia de fluorescência e a microscopia confocal.

A partir da microscopia de fluorescência realizada com o corante DAPI Sigma-Aldrich® (Figuras 10 a 14), pode-se visualizar a presença de *S. aureus* (MRSA) em *A. polyphaga* em 24, 48, 72, 96 e 192 horas de cocultivo. O mesmo foi observado a partir da microscopia confocal com DAPI Sigma-Aldrich® (Figuras 15 a 19) e Cell Tracker™ CM-DIL (Figuras 20 a 24) em 24, 48, 72, 96 e 216 horas de cocultivo, mostrando que ambos os microrganismos permaneceram viáveis ao longo do experimento.

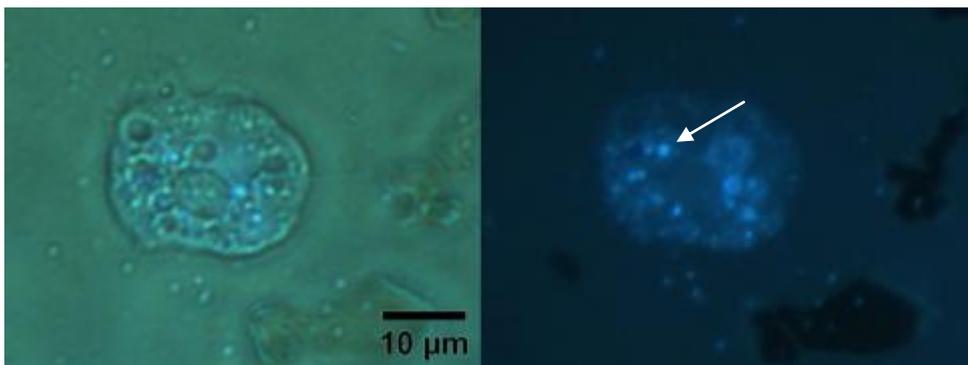


Figura 10: Microscopia de fluorescência mostrando *Staphylococcus aureus* (MRSA) internalizados em trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga* em 24 horas de cocultivo. Coloração bacteriana realizada com DAPI Sigma-Aldrich® (visualizado em azul fluorescente). Barra de escala = 10 μm .

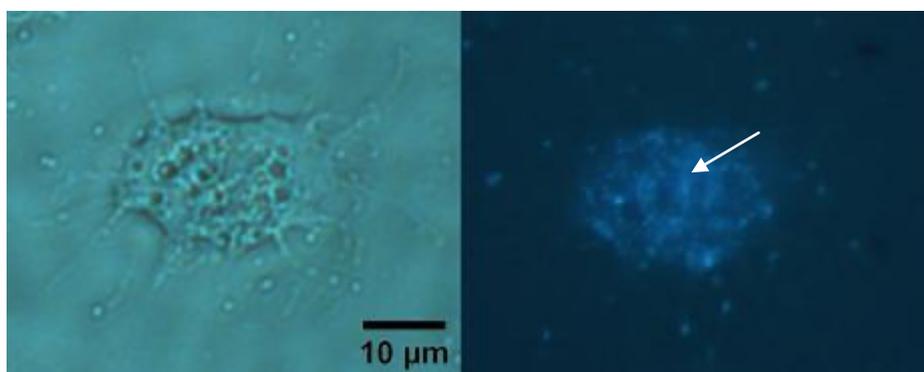


Figura 11: Microscopia de fluorescência mostrando *Staphylococcus aureus* (MRSA) internalizados em trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga* em 48 horas de cocultivo. Coloração bacteriana realizada com DAPI Sigma-Aldrich® (visualizado em azul fluorescente). Barra de escala = 10 μm .

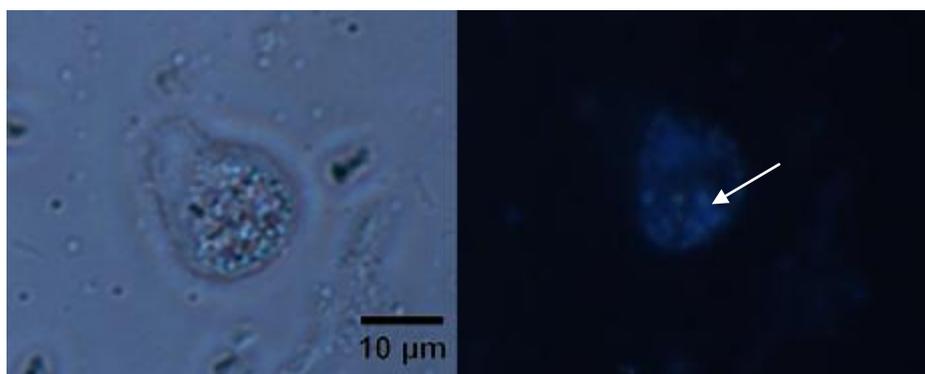


Figura 12: Microscopia de fluorescência mostrando *Staphylococcus aureus* (MRSA) internalizados em trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga* em 72 horas de cocultivo. Coloração bacteriana realizada com DAPI Sigma-Aldrich® (visualizado em azul fluorescente). Barra de escala = 10 μm .

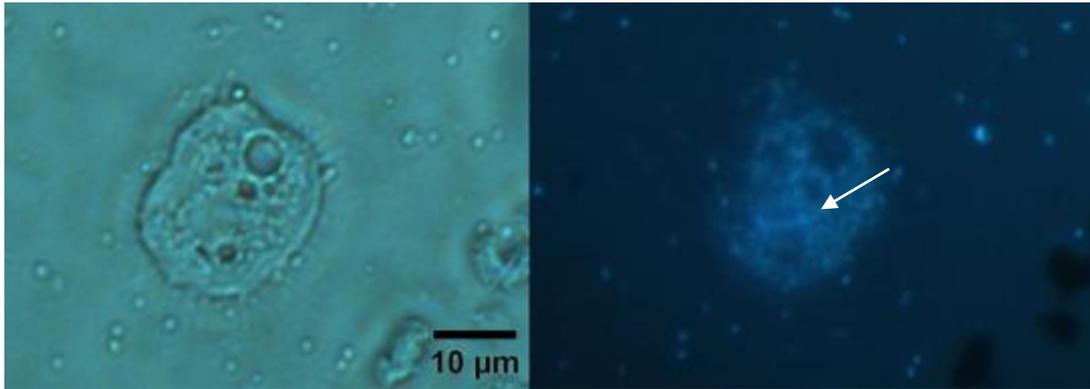


Figura 13: Microscopia de fluorescência mostrando *Staphylococcus aureus* (MRSA) internalizados em trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga* em 96 horas de cocultivo. Coloração bacteriana realizada com DAPI Sigma-Aldrich® (visualizado em azul fluorescente). Barra de escala = 10 µm.

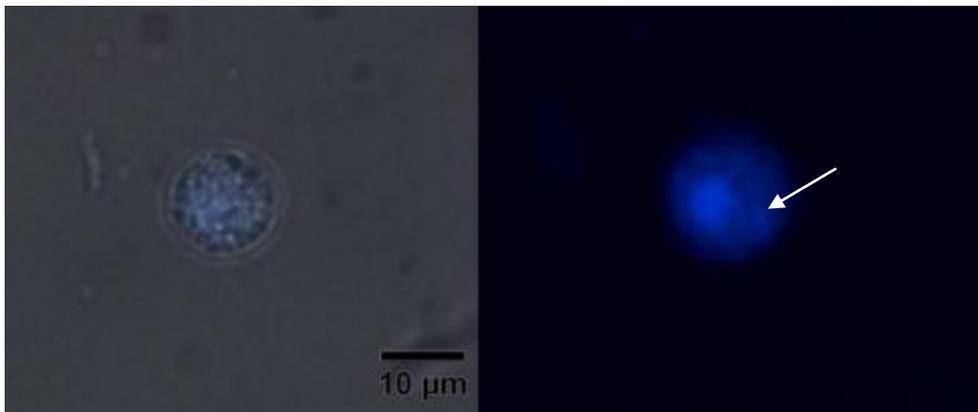


Figura 14: Microscopia de fluorescência mostrando *Staphylococcus aureus* (MRSA) internalizados em *Acanthamoeba polyphaga* (forma de cisto) em 192 horas de cocultivo. Coloração bacteriana realizada com DAPI Sigma-Aldrich® (visualizado em azul fluorescente). Barra de escala = 10 µm.

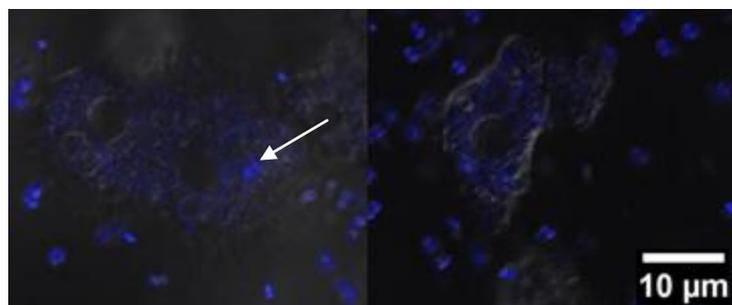


Figura 15: Microscopia confocal mostrando *Staphylococcus aureus* (MRSA) internalizados em trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga* em 24 horas de cocultivo. Coloração bacteriana realizada com DAPI Sigma-Aldrich® (visualizado em azul fluorescente). Barra de escala = 10 µm.

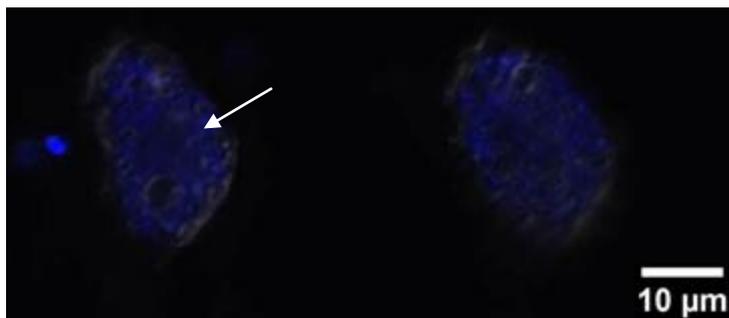


Figura 16: Microscopia confocal mostrando *Staphylococcus aureus* (MRSA) internalizados em trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga* em 48 horas de cocultivo. Coloração bacteriana realizada com DAPI Sigma-Aldrich® (visualizado em azul fluorescente). Barra de escala = 10 μm.



Figura 17: Microscopia confocal mostrando *Staphylococcus aureus* (MRSA) internalizados em *Acanthamoeba polyphaga* (forma de cisto) em 72 horas de cocultivo. Coloração bacteriana realizada com DAPI Sigma-Aldrich® (visualizado em azul fluorescente). Barra de escala = 10 μm.

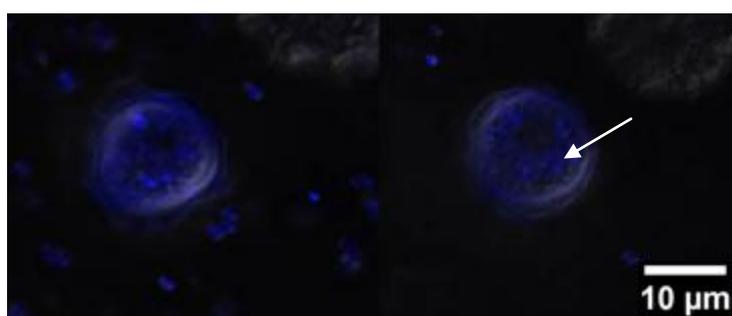


Figura 18: Microscopia confocal mostrando *Staphylococcus aureus* (MRSA) internalizados em *Acanthamoeba polyphaga* (forma de cisto) em 96 horas de cocultivo. Coloração bacteriana realizada com DAPI Sigma-Aldrich® (visualizado em azul fluorescente). Barra de escala = 10 μm.

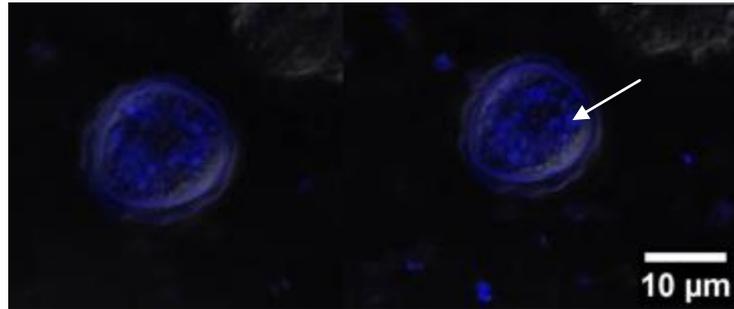


Figura 19: Microscopia confocal mostrando *Staphylococcus aureus* (MRSA) internalizados em *Acanthamoeba polyphaga* (forma de cisto) em 216 horas de cocultivo. Coloração bacteriana realizada com DAPI Sigma-Aldrich® (visualizado em azul fluorescente). Barra de escala = 10 μm.

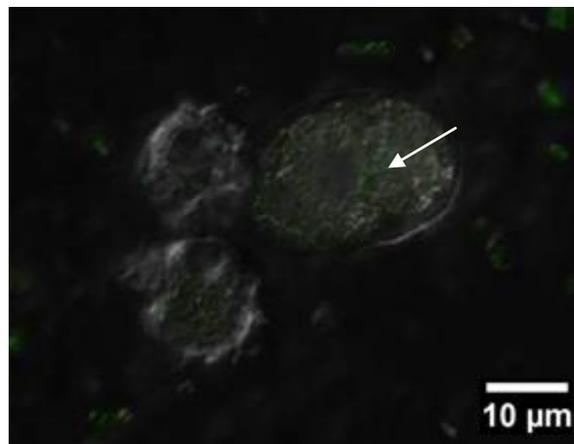


Figura 20: Microscopia confocal mostrando *Staphylococcus aureus* (MRSA) internalizados em trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga* em 24 horas de cocultivo. Coloração bacteriana realizada com Cell Tracker™ CM-DIL (visualizado em verde fluorescente). Barra de escala = 10 μm.

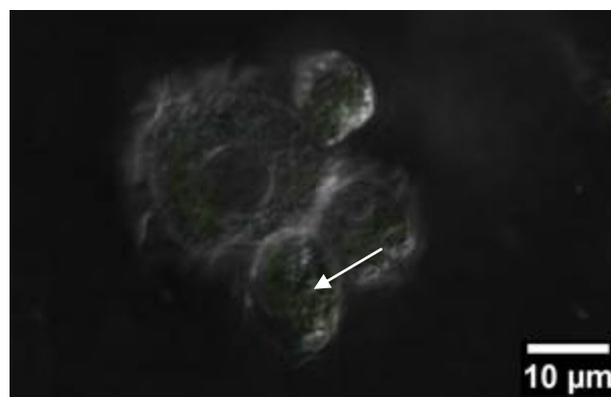


Figura 21: Microscopia confocal mostrando *Staphylococcus aureus* (MRSA) internalizados em trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga* em 48 horas de cocultivo. Coloração bacteriana realizada com Cell Tracker™ CM-DIL (visualizado em verde fluorescente). Barra de escala = 10 μm.

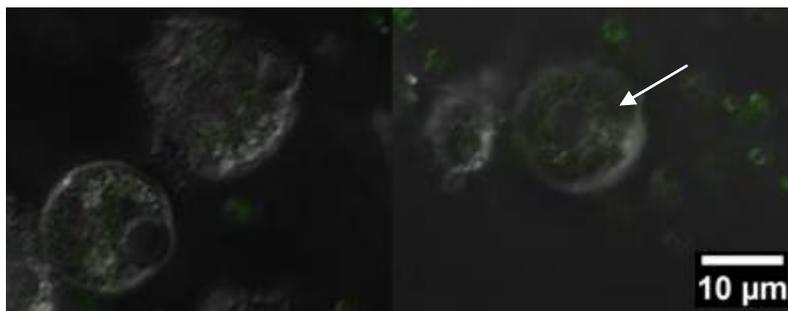


Figura 22: Microscopia confocal mostrando *Staphylococcus aureus* (MRSA) internalizados em trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga* em 72 horas de cocultivo. Coloração bacteriana realizada com Cell Tracker™ CM-DIL (visualizado em verde fluorescente). Barra de escala = 10 μm.

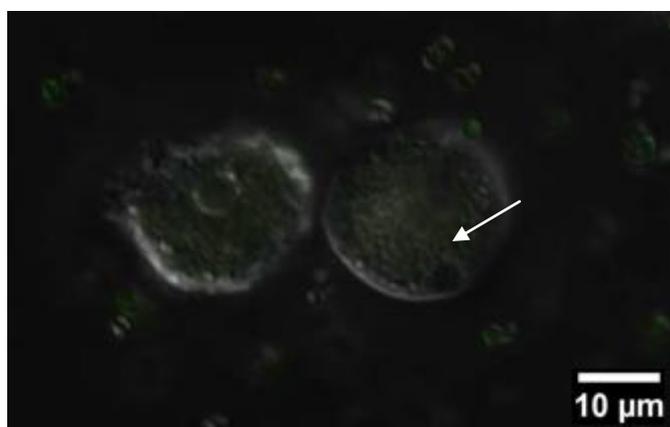


Figura 23: Microscopia confocal mostrando *Staphylococcus aureus* (MRSA) internalizados em trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga* em 96 horas de cocultivo. Coloração bacteriana realizada com Cell Tracker™ CM-DIL (visualizado em verde fluorescente). Barra de escala = 10 μm.

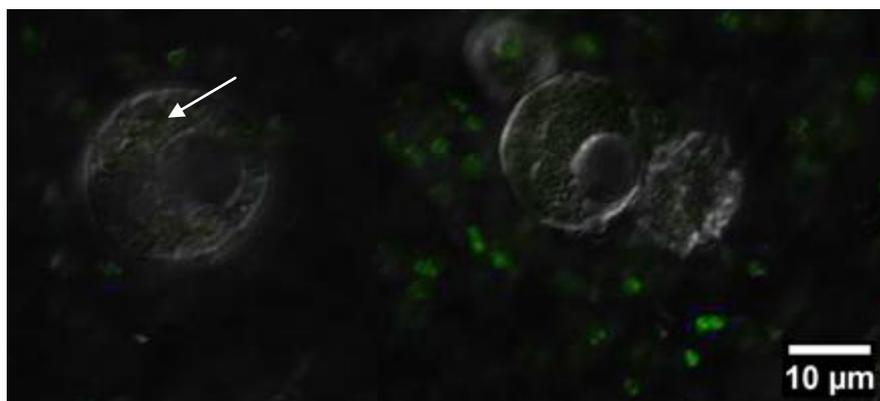


Figura 24: Microscopia confocal mostrando *Staphylococcus aureus* (MRSA) internalizados em trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga* em 216 horas de cocultivo. Coloração bacteriana realizada com Cell Tracker™ CM-DIL (visualizado em verde fluorescente). Barra de escala = 10 μm.

Segundo Khan (2006), existem estudos mostrando que a interação com *Acanthamoeba* spp. pode atuar como um “treinamento” em que bactérias desenvolvem estratégias para escapar da fagocitose, conseqüentemente tornando-se mais resistentes ao ataque de macrófagos. Os mecanismos utilizados por essas bactérias para escapar à fagocitose de amebas seriam os mesmos utilizados para escapar à fagocitose e/ou sobreviver em macrófagos.

Abul e colaboradores (2008) destacaram que *Staphylococcus aureus* possui a capacidade de resistir à fagocitose e de replicar-se no interior dos fagócitos, estimulando a produção de IL-12. Esta citocina ativa as células NK que passam a produzir IFN- γ com a finalidade de aumentar a produção de substâncias microbicidas no interior dos fagócitos, promovendo a destruição destas através da liberação de perforina e granzima que culmina com a apoptose da célula alvo e eliminação do agente infeccioso.

Ainda, é importante ressaltar que o uso de *Acanthamoeba* como um reservatório bacteriano é uma propriedade importante para que estes agentes bacterianos patogênicos sobrevivam intracelularmente, mas também se multipliquem no interior da ameba (Greub e Raoult, 2004). Isso corrobora com o presente estudo, em que *S. aureus* (MRSA) permaneceu viável por longos períodos no interior de *A. polyphaga*.

A adaptação de bactérias para sobreviver internalizadas em amebas de vida livre pode também contribuir para a sua virulência, fazendo com que estes organismos sejam capazes de infectar células humanas. A relação entre a virulência e a capacidade de replicação no interior destes protozoários também foi demonstrada por Molmeret et al. (2001), que estudaram a cinética de crescimento de dois isolados clínicos de *L. pneumophila* em *Acanthamoeba*.

No estudo de Anacarso et al. (2012) os resultados confirmaram a capacidade das bactérias testadas crescerem dentro de *A. polyphaga*. *E. faecalis* e *S. aureus* foram capazes de persistir e crescer no meio intracelular, apresentando contagens elevadas de células, demonstrando adaptação ao ambiente intracelular sem causar lise celular do hospedeiro. Em outro estudo semelhante realizado por Huws et al. (2008) foi demonstrado que *S. aureus* pode sobreviver e até mesmo multiplicar-se dentro de *A. polyphaga*.

As interações entre bactérias e protozoários após dias de cocultivo, são geralmente caracterizadas por dois tipos de tendências “predador-presa”: digestão

em um vacúolo alimentar e morte das bactérias ingeridas utilizadas como fonte de alimento pela ameba; ou adaptação, sobrevivência e multiplicação bacteriana, como evidenciada com o isolado de *S. aureus* (MRSA) no presente estudo.

Mais recentemente, Huws et al. (2006) comprovaram a sobrevivência e proliferação de MRSA em *Acanthamoeba castellanii*. Os resultados revelaram que isolados de MRSA, MSSA e *Staphylococcus epidermidis* apresentaram semelhança nas interações em macrófagos-like (ThP1) e *A. castellanii*, em que sobreviveram e multiplicaram-se no interior de ambos após 48 horas em comparação a 24 horas de incubação, sugerindo que ambos os isolados permanecem viáveis nos dois hospedeiros durante um longo período de tempo.

O presente estudo confirma a evidência de que *S. aureus* (MRSA) permaneceu viável até mesmo em cistos de *A. polyphaga*, que são formas de resistência do protozoário, demonstrado através de microscopia confocal (Figuras 18, 19 e 20) e microscopia de fluorescência (Figura 15), reforçando a hipótese de que *Acanthamoeba* pode desempenhar um papel crucial na propagação de *S. aureus* (MRSA) na comunidade e ambiente hospitalar.

Além disso, a sobrevivência e crescimento intracelular em *Acanthamoeba* podem afetar as bactérias em alguns aspectos: alterações no fenótipo bacteriano podem melhorar as suas propriedades invasivas nos macrófagos em comparação quando cultivadas em meio de cultura, bem como o aumento da resistência das bactérias a condições extracelulares, tais como antimicrobianos e desinfetantes (Adekambi et al. 2006; Tomov et al. 1999).

Matz e Jurgens (2005) ressaltaram que alguns receptores de superfície celular também podem influenciar em várias características bacterianas, incluindo tamanho, motilidade, alterações fenotípicas, *status* fisiológico e uma variedade de mecanismos de defesa que podem tornar as bactérias mais ou menos resistentes à predação.

Em outro estudo de Cirillo et al. (1997), foi demonstrado que espécies do gênero *Mycobacterium* (*M. marinum*, *M. fortuitum* e *M. avium*) replicaram-se no interior de *A. castellanii*, enquanto espécies não patogênicas como *M. smegmatis* foram utilizadas apenas como fonte de alimento para as amebas.

Esse tipo de interação também foi descrito para *L. pneumophila*. Primeiramente as bactérias são fagocitadas, seguido pela rápida multiplicação no fagossoma da ameba. Durante a fase estacionária de crescimento, *Legionella* é capaz de desencadear um mecanismo que conduz à lise da célula amebiana, resultando na

liberação de vesículas cheias de bactérias, podendo ser uma forma de infecção aos seres humanos (Kilvington e Price, 1990).

Em geral, as interações “ameba-bactéria” são ainda consideradas altamente complexas, sendo que podem ser influenciadas por fatores de virulência destes organismos ou até mesmo por condições ambientais em que se encontram.

5.7 Influência de *Staphylococcus aureus* (MRSA) no processo de encistamento de *Acanthamoeba polyphaga*

Tendo em vista que o maior desafio no manejo de ceratite por *Acanthamoeba* é a erradicação eficaz dos cistos, que são resistentes à maioria das drogas antimicrobianas, este experimento consistiu em avaliar o efeito de *Staphylococcus aureus* (MRSA) sobre o encistamento de *Acanthamoeba polyphaga*.

A Figura 25 demonstra o percentual de amebas encistadas em relação ao tempo de incubação (24, 48, 72 e 96 horas) em diferentes condições: amebas + PBS (controle); amebas + MRSA + TRIS; amebas + TRIS; e amebas + MRSA (cocultivo de ambos os microrganismos).

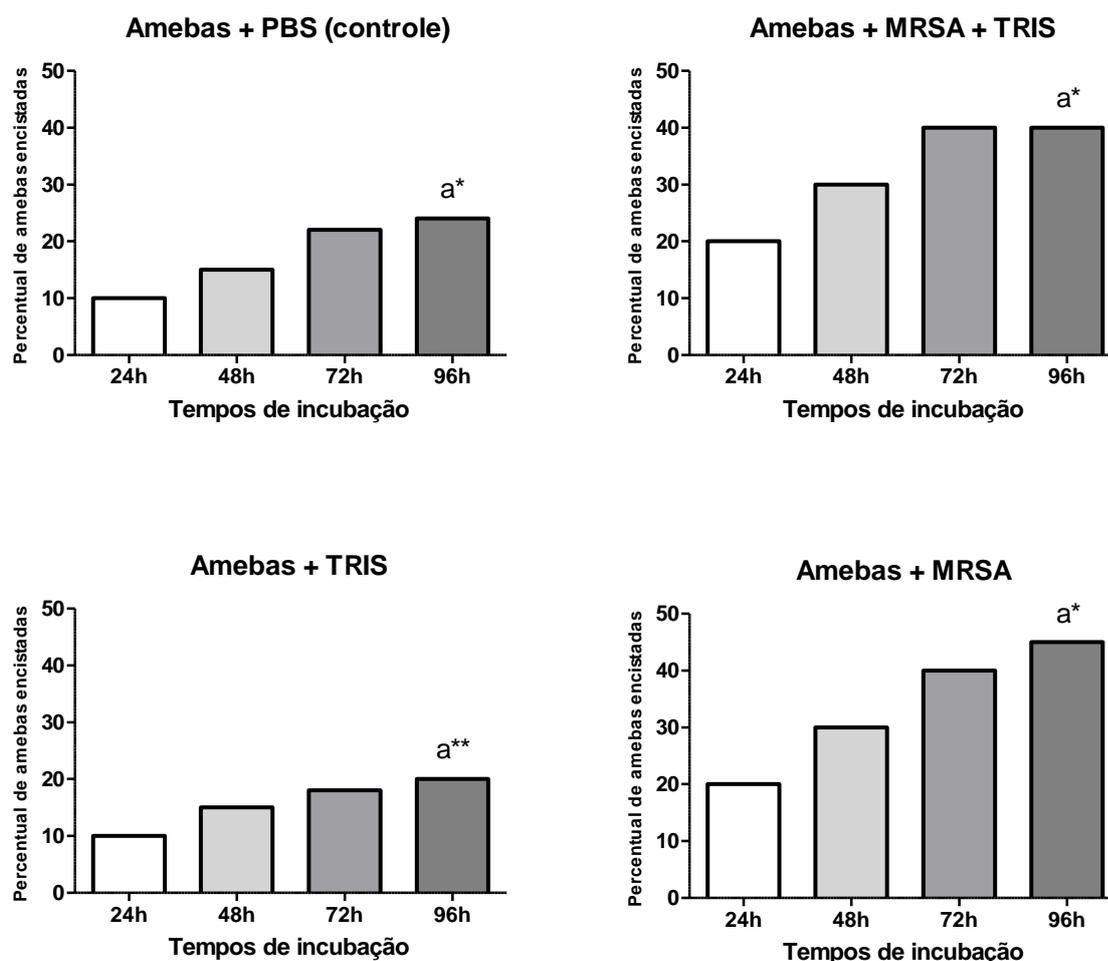


Figura 25: Influência de *S. aureus* (MRSA) no processo de encistamento de *A. polyphaga*. O número de cistos e trofozoítos foram determinados em triplicata para cada uma das condições: Amebas + PBS (controle); Amebas + MRSA + TRIS; Amebas + TRIS e Amebas + MRSA. Barras representam a mediana de testes realizados em triplicata. Kruskal-Wallis seguindo de pós-teste de Dunn's. a = em relação à 24h. * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$.

Houve diferença significativa nas diferentes condições apresentadas acima entre 24 horas de incubação em comparação a 96 horas de incubação. Sendo assim, *A. polyphaga* cocultivada em PBS (controle) apresentou um valor de $p \leq 0.05$, da mesma forma que quando em contato com *Staphylococcus aureus* (MRSA) + TRIS (solução que induz ao encistamento do protozoário) e quando em contato somente com a bactéria. Observa-se que apenas quando *A. polyphaga* foi cocultivada com TRIS é que houve um valor de $p \leq 0.01$.

Não foi observada diferença significativa entre os demais tempos de incubação, apesar de ser possível observar uma tendência ao aumento do percentual de encistamento conforme o aumento de tempo de incubação.

Ainda assim, pode-se concluir que o maior percentual de amebas encistadas deu-se em 96 horas de incubação (aproximadamente 45%) quando cocultivadas com o isolado de *S. aureus* (MRSA), apresentando um aumento progressivo deste percentual a cada período de incubação.

Alguns endossimbiontes bacterianos, como é o caso da espécie bacteriana em estudo, são capazes de sobreviver ao encistamento de amebas, pois a localização intracelular os protege de condições ambientais adversas (Greub e Raoult, 2004).

Panjwani (2010) ressaltou ainda que os cistos são estruturas altamente resistentes a tratamentos com agentes biocidas e são capazes de sobreviver em condições adversas, persistindo no estroma durante o tratamento, mas quando estas condições se tornam novamente favoráveis, a ameba pode desencistar, resultando no retorno da infecção. Dessa forma, o favorecimento da formação de cistos por *S. aureus* (MRSA) é bastante preocupante, pois pode acarretar na persistência da ameba no sítio de infecção.

Quando *Acanthamoeba* spp. é submetida a condições adversas do meio, pode ocorrer mudança em seu fenótipo, formando cistos. Essa habilidade de diferenciação de trofozoíto a cisto é conhecida como mudança fenotípica, a qual pode representar a habilidade de *Acanthamoeba* spp. em alternar a expressão de proteínas e glicoproteínas de superfície, que por sua vez, podem auxiliar a ameba a evadir do sistema imune (Khan, 2004).

No presente estudo, a cepa de origem clínica de *A. polyphaga* teve seu maior percentual de encistamento na presença de *S. aureus* (MRSA), onde este provavelmente atuou como um agente estressor para que houvesse esta mudança fenotípica na ameba.

Com isso, há uma necessidade definitiva de compreender melhor as interações entre amebas e seus endossimbiontes, tendo em vista que a virulência pode estar relacionada a características fisiológicas de cepas de *Acanthamoeba* (Walochnik et al. 2000).

6. CONCLUSÃO

Através da interação entre *Acanthamoeba polyphaga* e *Staphylococcus aureus* (MRSA) pelo modelo de cocultivo pode-se afirmar que houve um pequeno percentual de amebas inviabilizadas após contato com a bactéria.

S. aureus (MRSA) foi visualizado no interior de *A. polyphaga* através de microscopia confocal e de fluorescência em até 216 horas de cocultivo, sendo considerado um microrganismo resistente à ameba.

O contato de *A. polyphaga* com o isolado de *S. aureus* (MRSA) não demonstrou alteração fenotípica da ameba através dos testes fisiológicos de tolerância à temperatura e concentração molar. Desta forma, ressalta-se a importância da realização de outros testes para definir a patogenicidade de *A. polyphaga*.

O lisado da cultura amebiana aumentou o crescimento de *S. aureus* (MRSA) em cultivo nos diferentes tempos de incubação, porém houve diferença significativa apenas entre o controle e 96 horas de cocultivo.

O crescimento de *S. aureus* (MRSA) foi inibido ao longo dos tempos de incubação pelo efeito do sobrenadante da cultura amebiana tendo havido diferença significativa apenas entre o controle e 96 horas de cocultivo. Sugere-se que *A. polyphaga* tenha secretado algum tipo de metabólito que promoveu a inibição do crescimento da bactéria.

A interação dos microrganismos não apresentou alterações significativas no perfil de susceptibilidade aos antibióticos testados. Dessa forma, há necessidade de maiores investigações visando compreender melhor as interações entre amebas e seus endossimbiontes, bem como a relação de seus fatores de virulência em estudos de susceptibilidade às drogas.

S. aureus (MRSA) permaneceu viável até mesmo em cistos de *A. polyphaga*, mostrados através de microscopia confocal e microscopia de fluorescência, reforçando a hipótese de que *Acanthamoeba* pode desempenhar um papel crucial na propagação de *S. aureus* (MRSA) na comunidade e ambiente hospitalar.

O maior percentual de amebas encistadas deu-se em 96 horas de incubação quando cocultivadas com o isolado de *S. aureus* (MRSA), apresentando um aumento progressivo deste percentual a cada período de incubação.

A cepa de origem clínica de *A. polyphaga* teve seu maior percentual de

encistamento na presença de *S. aureus* (MRSA), onde este provavelmente atuou como um agente estressor para que houvesse esta mudança fenotípica na ameba.

Estudos devem intensificar-se para melhor compreender os mecanismos de virulência envolvidos na interação entre *A. polyphaga* e *S. aureus*.

PERSPECTIVAS

Confirmar a presença do isolado de *Staphylococcus aureus* (MRSA) em todos os tempos de cocultivo com *Acanthamoeba polyphaga* através de PCR convencional, utilizando oligonucleotídeos específicos para a espécie.

7. REFERÊNCIAS

- Abul KA, Lichtman AH. 2008. *Imunologia Celular e Molecular*. 6ª ed. Elsevier. Rio de Janeiro.
- Adekambi T, Salah SB, Khlif M, Raoult D, Drancourt M. 2006. Survival of environmental Mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5974–81.
- Ahearn DG, Gabriel MM. 1997. Contact lenses, disinfectants and *Acanthamoeba* keratitis. *Advances in Applied Microbiology*. 43:35-56.
- Allen PG, Dawidowicz EA. 1990. Phagocytosis in *Acanthamoeba*. A mannose receptor is responsible for the binding and phagocytosis of yeast. *J. Cell. Physiol.* 145:508–13.
- Alsam S, Khan N. 2009. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* interactions with *Acanthamoeba*; abstract booklet Free Living Amoebae (FLAM) meeting, Teneriffa.
- Alsam S, Ryoul JS, Sissons J, Dudely R, Kwang SK, Khan NA. 2006. *Escherichia coli* interaction with *Acanthamoeba*: a symbiosis with environmental and clinical implication. *J Med Microbiol.* 55:689-94.
- Anacarso I, Niederhäusern SD, Messi P, Guerrieri E, Iseppi R, Sabia C, Bondi M. 2012. *Acanthamoeba polyphaga*, a potential environmental vector for the transmission of food-borne and opportunistic pathogens. *Journal of Basic Microbiology*. 52:261–68.
- Awwad ST, Petroll WM, McCulley JP, Cavanagh HD. 2007. Updates in *Acanthamoeba* keratitis. *Eye and Contact Lens*. 33:1-8.
- Baarden PV, Belkum AV, Summerbell RC, Crous PW, Thomma BPHJ. 2007. Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop

cross-kingdom host jumps? FEMS Microbiology Reviews. 31:239-47.

Bannerman TL. 2003. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. Manual of clinical microbiology. Washington: American Society for Microbiology. 384-04.

Benitez, LB et al. 2011. Antimicrobial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 is enhanced in the presence of *Escherichia coli*. Current Microbiology. 62:1017-22.

Biasoli WM, Araripe CA, Lima JMO, Lopes E. 1981. Meningoencefalite amebiana de origem hídrica diagnosticada pelo exame do Líquor. Apresentação de dois casos. Resumo do 15º Congr. Bras. Patol. Clín. São Paulo, 56 p.

Bottone EJ, Perez AA, Gordon RE, Qureshi MN. 1994. Differential binding capacity and internalization of bacterial substrates as factors in growth rate of *Acanthamoeba* spp.. Journal of Medical Microbiology. 40:148-54.

Bowers B, Korn ED. 1969. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain) II. Encystment. The Journal of cell biology. 41:786-05.

Brandt FH, Ware DA, Visvesvara GS. 1989. Viability of *Acanthamoeba* cysts in ophthalmic solutions. Applied Environmental Microbiology. 55:1144–46.

Campos R, Gomes MCD, Pringenzi LS, Stecca J. 1977. Meningoencefalite por ameba de vida livre. Apresentação do primeiro caso latino americano. Rev. Inst. Med. Trop. 19:349-51.

Carlesso AM, Artuso GL, Caumo K, Rott MB. 2010. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. Curr Microbiol. 60(3):185-90.

Carvalho FG, Moura H, Guimarães FD, Salazar HC, Gonçalves AJ, Lomelino MR, Ávila CM. 1983. Meningoencefalite amebiana primária. Relato de caso. Rev. Bras. Neurol. 19:83-6.

Casadevall A, Pirofski LA. 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and Immunity*. 67:3703-13.

Cassettari VC, Strabelli T, Medeiros EAS. 2005. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? *Braz J Infect Dis*. 9(1):70-76.

Caumo K, Frasson AP, Pens CJ, Panatieri LF, Frazzon AP, Rott MB. 2009. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. *Ann Trop Med Parasitol*. 103(6):477-485.

Chan L, Mak J, Low Y, Koh T, Ithoi I, Mohamed SM. 2011. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* spp. from air-conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. *Acta Tropica*. 117:23–30.

Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS, Bermudez LE. 1997. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun*. 65(9):3759-67.

Clarke DW, Niederkorn JY. 2006. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Trends in Parasitology*. 22:175-80.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Eighth Edition. CLSI document M100-S17 [ISBN 1-56238-625-5]. Clinical and Laboratory Standards Institute 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania.

Cruvinel AR, Silveira AR, Soares JS. 2011. Perfil antimicrobiano de *Staphylococcus aureus* isolado de pacientes hospitalizados em UTI no Distrito Federal. *Cenarium Farmacêutico*. 4(4).

Culbertson CG, Smith JW, Minner H. 1958. *Acanthamoeba*: observations on animal pathogenicity. *Science*. 127:1506.

Davis JS. 2005. Management of bone and joint infections due to *Staphylococcus aureus*. *Int Med J*. 35:79-96.

De Jonckheere J. 1977. Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and nonpathogenic isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 33:751-57.

Douesnard-Malo F, Daigle F. 2011. Increased persistence of *Salmonella enterica* serovar Typhi in the presence of *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(21):7640–46.

Euzéby JP. 2007. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 47:590-92.

Felden B, Vandenesch F, Bouloc P, Romby P. 2011. The *Staphylococcus aureus* and its commitment to virulence. *PLoS Pathog*. 7:1-10.

Fieseler L, Doyscher D, Loessner MJ, Schuppler M. 2014. *Acanthamoeba* release compounds which promote growth of *Listeria monocytogenes* and other bacteria. *Applied Microbiology Biotechnology*. 98:3091–97.

Foronda AS. 1979. Observações sobre amebas de vida livre potencialmente patogênicas. Tese. Inst. Cienc. Biom. Univ. São Paulo.

Garrity GM, Holt JG. 2001. The road map to the manual. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, New York: Berlin: Springer-Verlag 1, 119-166 p.

Greub G, Raoult D. 2002. Parachlamydiaceae: potential emerging pathogens. *Emerging infectious diseases*. 8(6):625–30.

Greub G, la SB, Raoult D. 2003. *Parachlamydia acanthamoeba* is endosymbiotic or lytic for *Acanthamoeba polyphaga* depending on the incubation temperature. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 990:628–34.

Greub G, Raoult D. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical Microbiology Reviews*. 17:413-33.

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.

Horn M, Wagner M. 2004. Bacterial endosymbionts of free-living amoebae. *Journal of Eukaryotic Microbiology.* 51:509-15.

Huws SA, Smith AW, Enright MC, Wood PJ, Brown MRW. 2006. Amoebae promote persistence of epidemic strains of MRSA. *Environ. Microbiol.* 8:1130–33.

Huws SA, Morley RJ, Jones MV, Brown MRW, Smith AW. 2008. Interactions of some common pathogenic bacteria with *Acanthamoeba polyphaga*. *FEMS Microbiol Lett.* 282:258–65.

Illingworth CD, Cook SD. 1998. *Acanthamoeba* keratitis. *Survey of ophthalmology.* 42(6):493–08.

Jones BR, Mc Gill JI, Steele ADM. 1975. Recurrent suppurative kerato-uveitis with loss of eye due to infection by *Acanthamoeba castellanii*. *Trans. Ophthalmol. Soc. U.K.* 95:210-13.

Khan NA. 2003. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microbial Pathogenesis.* 34:277-85.

Khan NA. The pathogenesis of *Acanthamoeba* infections: current status and future implications. 2004. Eyetext. Disponível em: <<http://eprints.bbk.ac.uk/policies.html>>. Acesso em 20 de fevereiro de 2015.

Khan NA. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews.* 30:564-95.

Khan NA. 2007. *Acanthamoeba* invasion of the central nervous system. *International Journal for Parasitology.* 37:131-38.

Khan NA, Jarroll EL, Paget TA. 2001. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. *Current Microbiology*. 43:204-08.

Khan NA, Tareen NK. 2003. Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and pathogenicity-based categorization of *Acanthamoeba* strains. *Folia Parasitol*. 50:97-04.

Kilvington S, Price J. 1990. Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J Appl Bacteriol*. 68(5): 519-25.

Kloos WE, Bannerman TL. 1999. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, PR et al. (Eds). *Manual of clinical microbiology*. Washington: American Society for Microbiology. 264-282 p.

Koehsler M, Leitsch D, Fuernkranz U, Duchene M, Aspoeck H, Walochnik J. 2008. *Acanthamoeba* strains lose their abilities to encyst synchronously upon prolonged axenic culture. *Parasitology Research*. 102:1069–72.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. 2001. *Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido*. 5 ed. Rio de Janeiro: Medsi.

Kumar R, Lloyd D. 2002. Recent advances in the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Clinical Infectious Diseases*. 35:434-41.

Lee XY, Reimann C, Greub G, Sufrin J, Croxatto A. 2012. The *Pseudomonas aeruginosa* toxin L-2-amino-4-methoxy-trans-3-butenoic acid inhibits growth and induces encystment in *Acanthamoeba castellanii*. *Microbes Infect*. 14:268–72.

Lorenzo-Morales J, Monteverde-Miranda CA, Jimenez C, Tejedor ML, 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.

Marciano-Cabral F, Cabral G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. Clin. Microbiol. Rev. 16(2):273-07.

Martinez AJ, Sotelo-Avila C, Garcia-Tamayo J, Moron JT, Willaert E, Stamm WP. 1977. Meningoencephalitis due to *Acanthamoeba* sp. pathogenesis and clinico-pathological study. Acta Neuropathol. 31:83-91.

Martinez AJ, Visvesvara GS. 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. Brain Pathology. 7(1):583–98.

Matz C, Jurgens K. 2005. High motility reduces grazing mortality of planktonic bacteria. Appl Environ Microbiol. 71:921–29.

Mazur T, Hadas E, Iwanicka I. 1995. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. Tropical medicine and parasitology. 46:106–08.

McClellan K, Howard K, Niederkorn JY, Alizadeh H. 2001. Effect of steroids on *Acanthamoeba* cysts and trophozoites. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 42:2885-93.

Molmeret M, Jarraud S, Morin JP, Pernin P et al. 2001. Different growth rates in amoeba of genotypically related environmental and clinical *Legionella pneumophila* strains isolated from a termal spa. Epidemiol. Infect. 126:231–39.

Morales JL, Rivas AO, Foronda P, Martínez E, Valladares B. 2005. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. Parasitology Research. 95:273-77.

Nagington J, Watson PG, Playfair TJ, McGill J, Jones BR, Steele AD. 1974. Amoebic infection of the eye. 1537-40.

Neff RJ. 1958. Mechanisms of purifying amoebae by migration on agar surfaces.

Journal of Protozoology. 5:226-31.

Niederhorn JY, Alizadeh H, Leher H, McCulley JP. 1999. The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. *Microbes and Infection*. 1:437-43.

Ohno A, Kato N, Sakamoto R, Kimura S, Yamaguchi K, 2008. Temperature dependent parasitic relationship between *Legionella pneumophila* and a free-living amoeba (*Acanthamoeba castellanii*). *Appl. Environ. Microbiol.* 74:4585–88.

Panjwani N. 2010. Pathogenesis of *Acanthamoeba* Keratitis. *The Ocular Surface*. 8(2):70–79.

Proca-Ciobanu M, Lupascu GH, Petrovici AI, Ionescu MD. 1975. Electron microscopy study of a pathogenic *Acanthamoeba castellanii* strain: the presence of bacterial endosymbionts. *International Journal for Parasitology*. 5:49-56.

Rey L. 1991. *Parasitologia*. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 24 p.

Ringsted J, Jager BV, Suk D, Visvesvara GS. 1976. Probable *Acanthamoeba* meningoencephalitis in a Korean child. *J. Clin. Pathol.* 66:723-30.

Rodríguez-Zaragoza S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critical Reviews in Microbiology*. 20(3):225–41.

Rossi F, Andreazzi D. 2005. Resistência bacteriana: Interpretando o antibiograma. Ed. Atheneu. São Paulo.

Schuster FL. 2002. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clinical Microbiology Reviews*. 15:342-54.

Schuster FL, Visvesvara GS. 2004. Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Veterinary Parasitology*. 126:91-120.

Schuster FL, Visvesvara GS. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*. 34:1001–27.

Seal D, Stapleton F, Dart J. 1992. Possible environmental sources of *Acanthamoeba* spp in contact lens wearers. *British Journal of Ophthalmology*. 76:424-27.

Siddiqui R, Khan NA. 2012a. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & Vectors*. 5:6–19.

Silva GJ, Souza IA, Higino JS, Siqueira-Junior JP, Pereira JV, Pereira MSV. 2007. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17.

Silva MA. 2001. Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de poeira de hospitais da cidade de Presidente Prudente – SP. Dissertação. Facul. Ciênc. Farmac. Univ. Est. São Paulo.

Steinert M, Birkness K, White E, et al. 1998. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Appl Environ Microbiol*. 64:2256–61.

Stevens AR, Willaert E. 1980. Drug sensitivity and resistance of four *Acanthamoeba* species. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 74:806-08.

Thompson RL, Cabezudo I, Wenzel RP. 1982. Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med*. 97:309-17.

Tomov A, Tsevtkova ED, Tomova IA, Michailova LI, Kassovski VK. 1999. Persistence and multiplication of obligate anaerobe bacteria in amoebae under aerobic conditions. *Anaerobe*. 5:19–23.

Tong SYC, Chen LF, Fowler-Jr VG. 2012. Colonization, pathogenicity, host susceptibility, and therapeutics for *Staphylococcus aureus*: what is the clinical relevance? *Semin Immunopathol.* 34:185-200.

Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, Makni F, Ayadi A. 2012. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Pathologic Biologie.* 60(6):399-05.

Valeru SP, Wai SN, Saeed A, Sandstrom G, Abd H. 2012. ToxR of *Vibrio cholera* affects biofilm, rugosity and survival with *Acanthamoeba castellanii*. *BMC Res Notes.* 5:33.

Vanessa B, Virginie M, Nathalie Q, Marie-Hélène R, Christine I. 2012. *Hartmannella vermiformis* can promote proliferation of *Candida* spp. in tap-water. *Water Research.* 46(17):5707–14.

Velázquez-Meza ME. 2005. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. *Salud Pública de México.* 47:381-87.

Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Medical microbiology immunology.* 50(1):1-26.

Walochnik J, Haller-Schober EM, Kölli H, Picher O, Obwaller RA, Aspöck H. 2000. Discrimination between clinically relevant and nonrelevant *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens- wearing keratitis patients in Austria. *Journal of clinical microbiology.* 38(11):3932–36.

Walochnik J, Obwaller A, Aspöck H. 2000. Correlations between Morphological, Molecular Biological, and Physiological Characteristics in Clinical and Nonclinical Isolates of *Acanthamoeba* spp. *Applied and Environmental Microbiology.* 66(10):4408-13.

Wang X, Ahearn DG. 1997. Effect of bacteria on survival and growth of *Acanthamoeba castellanii*. *Curr. Microbiol.* 34:212–15.

Willcox MDP, Holden BA. 2001. Contact lens related corneal infections. *Bioscience Reports.* 21:445-61.

Williams MD, Wilkins ST. 1994. *Manual of Determinative Bacteriology.* 9 ed. Bergey's.

Winiecka-Krusnell J, Linder E. 2001. Bacterial infections of free-living amoebae. *Research in Microbiology.* 152:613-19.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO A

Tampão fosfato salino (PBS) 10X concentrado

85,0 g de Cloreto de sódio (NaCl)

15,5 g de Fosfato de sódio bibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

2,3 g de Dihidrogenofosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

H_2O deionizada q.s.p. 1000 mL

Preparo: Todos os componentes foram dissolvidos juntos. O pH foi ajustado em $7,2 \pm 0,2$ e a solução esterilizada por autoclavagem (121°C por 15 min). Para o preparo da solução tampão fosfato de sódio 1X, uma parte da solução de PBS 10X foi misturada em nove partes de água destilada deionizada. A solução foi esterilizada por autoclavagem (121°C por 15 min).

8.2 ANEXO B

Solução Salina de Page

120 mg de Cloreto de sódio (NaCl)
4 mg de Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
142 mg de Hidrogenofosfato dissódico anidro (Na_2HPO_4)
136 mg Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)
4 mg de Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
Água destilada q.s.p 1000 mL

Preparo: Todos os componentes foram dissolvidos na ordem apresentada, com exceção do CaCl_2 que foi dissolvido separadamente e adicionado posterior ao resfriamento da solução. O pH foi ajustado em $6,5 \pm 0,2$ e a solução esterilizada por autoclavagem (121°C por 15 min).

Ágar não-nutriente (ANN)

100 mL de solução salina de Page (1X)
1,5 g de Ágar

Preparo: O ágar foi dissolvido em 100 mL da solução salina, aquecida até a completa dissolução e esterilizado por autoclavagem (121°C por 15 min). A distribuição do ANN foi realizada em placas bacteriológicas estéreis.

8.3 ANEXO C

Meio Proteose Peptona Extrato de Levedo e Glicose (PYG) pH 6,5 ± 0,2

7,5 g de Proteose peptona

0,75 g de Extrato de levedo

0,98 g de Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

0,059 g de Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

1 g de Citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

0,02 g de Sulfato ferroso amoniacal [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$]

0,034 g de Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)

0,355 g de Hidrogenofosfato dissódico anidro

15 g de Glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)

Água destilada q.s.p 1000 mL

Preparo: Todos os componentes foram dissolvidos na ordem apresentada, com exceção do CaCl_2 que foi dissolvido separadamente e adicionado posterior ao resfriamento da solução. O pH foi ajustado em 6,5 ± 0,2 e a solução esterilizada por autoclavagem (121°C por 15 min).