

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

**BIODIVERSIDADE DE AMEBAS DE VIDA LIVRE E BACTÉRIAS ASSOCIADAS A
AMEBAS EM RESERVATÓRIOS DE ÁGUA DE TORRES DE RESFRIAMENTO**

SCHEILA DA SILVA SOARES

Orientadora: Prof^a. Dra. Marilise Brittes Rott

Porto Alegre

Agosto/2016

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

**BIODIVERSIDADE DE AMEBAS DE VIDA LIVRE E BACTÉRIAS ASSOCIADAS A
AMEBAS EM RESERVATÓRIOS DE ÁGUA DE TORRES DE RESFRIAMENTO**

Scheila da Silva Soares

Farmacêutica – URI/ Santo Ângelo

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Marilise Brittes Rott

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Agosto/2016

CIP - Catalogação na Publicação

DA SILVA SOARES, SCHEILA
BIODIVERSIDADE DE AMEBAS DE VIDA LIVRE E BACTÉRIAS
ASSOCIADAS A AMEBAS EM RESERVATÓRIOS DE ÁGUA DE
TORRES DE RESFRIAMENTO / SCHEILA DA SILVA SOARES. --
2016.
67 f.

Orientadora: MARILISE BRITTES ROTT.

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. AMEBAS DE VIDA LIVRE. 2. BACTÉRIAS ASSOCIADAS A
AMEBAS. 3. CLASSIFICAÇÃO GENOTÍPICA. 4. TORRES DE
RESFRIAMENTO DE AR CONDICIONADO. I. BRITTES ROTT,
MARILISE, orient. II. Título.

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

“One child, one teacher, one book, one pen can change the world.”

Malala Yousafzai

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a DEUS, pelo dom da vida e pela sua presença em cada momento nela. Agradeço, pela capacidade para buscar os meus sonhos, sendo ELE minha rocha, minha fortaleza e o meu escudo.

Aos meus familiares que mesmo distante sempre torceram por mim. Aos meus pais Nocer Soares e Maria Helena, por me ensinarem o verdadeiro valor da vida e a importância de uma família no crescimento de um ser humano.

Às minhas irmãs Noemi, Ester, Miria e meu irmão Elton, pela amizade, preocupação, amor e carinho.

Em especial ao meu esposo Tiago Bittencourt de Oliveira, pelo amor, respeito e incentivo em todos os momentos, obrigada por seu meu amigo antes de tudo, e pelo pai maravilhoso que és!

À minha linda filha Maria Valentina, você é o meu maior presente, desculpa os momentos que estive ausente, mas isso é por você também, Te amo!

Aos meus sogros Tânia e Adroaldo, pelo carinho, apoio, incentivo e pelos cuidados que tiveram com minha filha durante minha ausência. Obrigada!

A professora Marilise Brittes Rott, minha orientadora, pela oportunidade, dedicação, conselhos, amizade e incentivo, você é um exemplo a ser seguido. O meu muito obrigada!

Às minhas colegas de laboratório Thamires Klein e Laura Fabres, agradeço pela amizade, apoio nos experimentos, trocas de experiências, pela parceria e pelas boas risadas, amo vocês. Obrigada por tudo!

Aos Bolsistas de Iniciação Científica Paula da Cruz e Francisco Kercher, pela dedicação e colaboração com meu trabalho, obrigada!

Aos demais colegas e professores do Laboratório de Parasitologia, pela convivência e amizade.

Ao professor Dr^o. Vlademir Cantarelli, pelo apoio, incentivo e colaboração no meu trabalho. Muitíssimo obrigada!

À Dr^a. Sueli Van Der Sand, pelo empréstimo do seu laboratório, Obrigada! Aos alunos do laboratório (209) pela compreensão, parceria e troca de materiais.

Aos colegas, amigos, professores e funcionários do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, obrigada pela convivência, troca de experiências e contribuições para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões –URI, em especial à Izabel Alves, Vera Andrade, Cristiane Kratz, Tiago Oliveira e Claudia Viegas, agradeço pelo incentivo, ensinamentos e apoio.

A minha amiga Franciane Senger pelo carinho, apoio e amizade. Muito obrigada!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro no decorrer desses dois anos.

O meu muito obrigada a todos!

BIODIVERSIDADE DE AMEBAS DE VIDA LIVRE E BACTÉRIAS ASSOCIADAS A AMEBAS EM RESERVATÓRIOS DE ÁGUA DE TORRES DE RESFRIAMENTO

Autor: Scheila da Silva Soares

Orientadora: Prof^a. Dra. Marilise Brittes Rott

RESUMO

Amebas de vida livre (AVL) são protozoários amplamente distribuídos na natureza e em ambientes artificiais. Alguns gêneros são oportunistas ou patogênicos, com característica anfizóica, são esses: *Acanthamoeba* spp., *Naegleria* spp., *Balamuthia* spp., *Sappinia* spp., e recentemente *Vermamoeba* spp. AVL podem servir de reservatórios de várias bactérias patogênicas, uma vez que se alimentam dessas no ambiente por fagocitose, algumas espécies de bactérias após internalizadas escapam da via de degradação sobrevivem e multiplicam-se no interior das amebas. Face ao exposto, o presente trabalho objetivou isolar e identificar AVL e as bactérias associadas presentes em águas de torres de resfriamento, cuja temperatura da água varia entre 25 a 30°C (ideal para o desenvolvimento de diversos microrganismos). Amebas foram isoladas em cultivo monoxênico com *Escherichia coli* inativadas pelo calor. Das amostras positivas, foram realizadas Reações em Cadeia de Polimerase (PCR), utilizando oligonucleotídeos específicos para cada gênero. Os produtos das PCR foram sequenciados e as sequências geradas foram comparadas com sequências parciais de cada gene alvo depositadas no *GenBank*. Das 36 amostras, 33 (91,66%) foram positivas para presença de AVL, destas 15 (45,4%) foram positivas para *Acanthamoeba* spp., 12 (36,3%) para *Naegleria* spp., 6 (18,2%) para *Vermamoeba* spp. Dos endossimbiontes pesquisados, somente *Pseudomonas* spp. foram identificadas em 13 (39,3%) isolados de AVL. Os resultados obtidos no presente estudo confirmam a presença de amebas de vida livre potencialmente patogênicas e carreadoras de bactérias patogênicas oportunistas que podem representar um risco à saúde humana.

Palavras-chave: Amebas de vida livre, bactérias associadas a amebas, classificação genotípica, torres de resfriamento.

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. (67 p.) Agosto, 2016.

BIODIVERSITY OF FREE- LIVING AMOEBAE AND BACTERIA ASSOCIATED WITH AMOBAE IN TANKS WATER FROM COOLING TOWERS

Author: Scheila da Silva Soares
Advisor: Prof. Dr. Marilise Brittes Rott

ABSTRACT

Free-living amoebae (FLA) are protozoa widely distributed in natural and artificial environments. Some genus are opportunistic or pathogenic, with anfizoic feature : *Acanthamoeba* spp., *Naegleria* spp., *Balamuthia* spp., *Sappinia* spp., and recently *Vermamoeba* spp. AVL may serve as reservoirs for various pathogenic bacteria, since they feed by phagocytosis in the environment, some species of bacteria after internalized escape to the pathway of degradation surviving and multiplying within the amoebae. The aim of this study was to isolate and identify FLA and their associated bacteria present in water from cooling tower, whose temperature water varies between 25 to 30 ° C (ideal for the development of different organisms). Amoebae were isolated in monoxenic cultivation with *Escherichia coli* inactivated by heat. Of the positive samples Polymerase Chain Reactions (PCR) were performed using specific primers for each genus. The PCR products were sequenced and the sequences were generated compared with partial sequences of each gene target deposited in GenBank. From the 36 samples, 33 (91.66%) were positive for the presence of FLA. Of these, 15 (45.4%) were positive for *Acanthamoeba* spp., 12 (36.3%) for *Naegleria* spp. and 6 (18.2 %) for *Vermamoeba* spp. Of the amoeba isolated, 13 (39.3%) were associated to bacteria wich belong to *Pseudomonas* genus (100%). Another bacteria investigated were absent. The results of this study confirm the presence of potentially pathogenic free-living amoebae as vehicles of opportunistic/pathogenic bacteria that can pose a risk to the human health.

Keywords: Free-living amoeba, bacteria associated with amoebae, genotypic classification, cooling towers.

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. (67 p.) August, 2016.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1 Objetivo Geral	2
2.2 Objetivos Específicos	2
3. REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1 Amebas de vida livre (AVL)	3
3.2 Classificação taxonômica	3
3.3 Ciclo de vida e classificação morfológica	4
3.4 Principais gêneros de AVL	5
3.4.1 Gênero <i>Acanthamoeba</i>	5
3.4.2 Gênero <i>Naegleria</i>	6
3.4.3 Gênero <i>Vermamoeba</i>	7
3.5 Interações entre amebas de vida livre e microrganismos.....	8
3.5.1 Mecanismos de interação entre ameba de vida livre e microrganismos.....	9
3.5.2 Torres de resfriamento de ar condicionado e seu papel na dispersão de microrganismos	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Local de desenvolvimento do projeto	14
4.2 Coletas	14
4.3 Processamento das amostras	14
4.3.1 Isolamento de amebas de vida livre.....	14
4.3.2 Obtenção de culturas monoxênicas.....	15
4.3.3 Clonagem celular dos isolados monoxênicos.....	15
4.3.4 Estudo morfológico dos isolados de AVL	15
4.3.5 Teste de exflagelação dos organismos	16
4.4 Estudo da patogenicidade de isolados de <i>Acanthamoeba</i> por testes fisiológicos de tolerância	16
4.4.1 Teste de Osmotolerância.....	16
4.4.2 Teste de Termotolerância.....	16
4.5 Identificação molecular dos Isolados.....	17
4.5.1 Extração do DNA genômico.....	17
4.5.2 Quantificação do DNA	17
4.6 Confirmação dos gêneros de amebas de vida livre e bactérias por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	17
4.6.1 Sequenciamento e análise dos fragmentos.....	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5.1 Isolamento de AVL em água de reservatórios de torres de resfriamento de ar condicionado.....	20
5.2 Identificação morfológica de isolados de <i>Acanthamoeba</i> spp.	21
5.3 Teste de Exflagelação	23
5.4 Estudo do potencial patogênico de <i>Acanthamoeba</i> utilizando testes de tolerância...	23

5.5 Identificação molecular dos isolados de AVL.....	26
5.6 Identificação de endossimbiontes nos isolados de AVL.....	30
6. CONCLUSÃO.....	36
7. PERSPECTIVAS.....	37
8. REFERÊNCIAS.....	38
9. APÊNDICES - Ofício de autorização.....	51
10 ANEXOS.....	52
10.1 ANEXO A – Solução Salina de Page & Meio de cultura (ANN).....	52
10.2 ANEXO B - Tampão fosfato salino (PBS) 10X concentrado.....	53

Lista de Tabelas

Tabela 1. Oligonucleotídeos gênero-específicos utilizados para as reações com suas respectivas sequências, genes alvos e tamanhos dos fragmentos.....	19
Tabela 2. Caracterização morfológica de isolados de AVL de reservatórios de água de torres de resfriamento de ar condicionado em Porto Alegre, RS - Brasil.....	23
Tabela 3. Diferenciação da patogenicidade de isolados de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	25
Tabela 4. Análise da similaridade entre as sequências parciais do gene 18S rDNA de <i>Acanthamoeba</i>	26
Tabela 5. Máxima porcentagem de similaridade encontrada entre as sequencias obtidas através da PCR para gênero <i>Naegleria</i> e as sequências publicadas no GenBank.....	28
Tabela 6. Máxima porcentagem de similaridade encontrada entre as sequencias obtidas através da PCR para <i>Vermamoeba</i> , e as sequências publicadas no GenBank.....	29
Tabela 7. Máxima porcentagem de similaridade encontrada entre as sequencias obtidas através do sequenciamento dos produtos da PCR <i>Pseudomonas</i> spp. e as sequências públicas do Genbank	32

Lista de Figuras

Figura 1. Cistos e trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i>	4
Figura 2. Imagem de <i>Naegleria fowleri</i>	5
Figura 3. Grupos morfológicos <i>Acanthamoeba</i>	6
Figura 4. Trofozoítos de <i>Hartmannella vermiformis</i>	8
Figura 5. Mecanismos de Invasão das bactérias em <i>Acanthamoeba</i> spp.....	10
Figura 6. Imagem torre de resfriamento.....	12
Figura 7. Placa de ANN com isolamento de AVL, cultivo não monóxênico.....	20
Figura 8. Placa de ANN com cultura monoxênica	21
Figura 9. Isolados de <i>Acanthamoeba</i> do grupo I, II e III.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcento
°C – Graus Celsius
µg – Microgramas
µL - Microlitros
ANN – Ágar Não Nutriente
ATCC – *American Type Culture Collection*
AVL – Ameba de Vida Livre
BLAST – Basic Local Alignment Culture Collection
BRA- Bactérias Resistentes a Amebas
CaCl₂ – Cloreto de Cálcio
DNA – Ácido Desoxiribonucleico
dNTP – Desoxiribonucleotídeos Fosfatados
EAG – Encefalite Amebiana Granulomatosa
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
HCl – Ácido clorídrico
M - Molar
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
MgSO₄ – Sulfato de Magnésio.
mL – Mililitro
mM – Micro Molar
mm – Milímetro
Na₂HPO₄ - hidrogenofosfato dissódico
NaCl – Cloreto de Sódio
NCBI – National Center for Biotechnology Information
PBS – *Phosphate buffered saline* (Tampão Fosfato Salino)
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
pmol – Picomol
PYG – Meio Protease, peptona e extrato de levedura
rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossomal
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
SNC – Sistema Nervoso Central
TAE – Tris acetato EDTA
Tris – Hidroximetil aminometano

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos amebas de vida livre (AVL), têm despertado interesse da comunidade científica, devido ao seu papel como agentes causadores de doenças, em particular infecções humanas graves e às vezes fatais, as AVL têm característica cosmopolita, sendo amplamente encontrada em diversos habitats, tais como: solo, ar, poeira, plantas, rios, lagos, piscinas, ambientes hospitalares, spas, estojos de lentes de contato, torres de resfriamento de ar condicionado, entre outros (Khan, 2006; Garcia *et al.*, 2013; Landell *et al.*, 2013; Trabelsi *et al.*, 2015).

Amebas de vida livre fazem parte de comunidades microbianas ambientais, principalmente em ambientes úmidos. Assim humanos e animais estão permanentemente em contato com AVL. Além disso, seu papel como predadoras de bactérias, contribui para a estabilidade dessas comunidades, desenvolvendo assim, a importante contribuição na manutenção do tamanho das populações, promovendo a diversidade de espécies, e sustentando o fluxo de energia e matéria através de teias alimentares. No entanto, foi a demonstração da possível patogenicidade, com a importante função de transmitir patógenos para seres humanos e animais, que incentivou estudos detalhados destes microrganismos e suas interações (Adékambi *et al.*, 2006; Goñi *et al.*, 2014).

Ao desempenharem função de carreadoras e servirem de reservatórios para bactérias, fungos, vírus e até outros protozoários como *Cryptosporidium* sp., as AVL desenvolvem um importante papel no ecossistema, pois estabelecem relações com esses microrganismos, que muitas vezes podem ser transitórias ou simbióticas. Diversas bactérias têm sido encontradas em associação com esses protozoários, por exemplo: *Mycobacterium avium*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, entre outras (Greub & Raoult, 2004; Berger *et al.*, 2006; Khan, 2006).

Devido à ampla dispersão das AVL no meio ambiente e ao importante papel que desempenham na manutenção e proliferação de bactérias patogênicas, e por servirem de veículos carreadores de patógenos, o presente trabalho propôs determinar a presença AVL e as bactérias associadas isoladas de reservatórios de água de torres de resfriamento de ar condicionado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar a presença de amebas de vida livre e bactérias associadas isoladas de reservatórios de água de torres de resfriamento de ar condicionado.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Isolar e identificar amebas de vida livre (AVL) presentes em amostras de águas de reservatórios de torres de resfriamento de ar condicionado.
- 2.2.2 Determinar a presença de bactérias associadas a AVL.
- 2.2.3 Realizar a caracterização molecular dos isolados pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e determinar o genótipo do gênero *Acanthamoeba*
- 2.2.4 Conhecer a distribuição ambiental das bactérias associadas a AVL e o risco de contaminação humana.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Amebas de vida livre (AVL)

Amebas de vida livre (AVL) são protozoários unicelulares, ubíquos e oportunistas, amplamente distribuídos na natureza, sendo isoladas, em ambientes naturais e/ou artificiais como lagos, rios, poeira, solo, ar, plantas, piscinas, estojos de lentes de contato, ambientes hospitalares, sistemas de abastecimento de água, torres de resfriamento de ar condicionado (Trabelsi *et al.*, 2012; Visvesvara *et al.*, 2007).

Alguns gêneros de AVL têm sido estudados em consequência das implicações para saúde humana, sendo responsáveis por infecções oportunistas e não oportunistas, como: *Vermamoeba* (*Hartmannella*), *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Naegleria*, *Sappinia*, e mais recentemente *Paravhalkampfia*, também associado a infecções em seres humanos e animais (Visvesvara *et al.*, 2007; Visvesvara *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2013). Estudos apontam que a *Vermamoeba vermiformis* (*Hartmannella vermiformis*) tem sido isolada de pacientes com ceratite amebiana, juntamente com *Acanthamoeba*, embora alguns autores não concordem que o gênero *Vermamoeba* seja considerado patogênico devido aos poucos relatos na literatura. Porém, estudos de citopatogenicidade *in vitro* têm demonstrado a patogenicidade desse gênero (Lorenzo-Morales *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2013; Armand *et al.*, 2016).

3.2 Classificação taxonômica

A taxonomia e a nomenclatura de AVL são frequentemente revisadas, devido a novos dados de estudos de sequenciamento genômico. A nova classificação foi baseada em características morfológicas, bioquímicas e em técnicas moleculares baseadas no sequenciamento do gene 18S rDNA. Atualmente a sociedade Internacional de Protistologistas classificou nos seguintes grupos e/ou “supergrupos”; chamados de Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata e Excavata. *Acanthamoeba* e *Balamuthia* foram incluídas no grupo Amoebozoa: (subdivisão: Acanthamoebidae), juntamente com *Sappinia* (subdivisão: Thecamoebidae), enquanto *Naegleria fowleri* no grupo Excavata (Heterolobosia: subdivisão Vahlkampfiidae (Stothard *et al.*, 1998; Visvesvara & Schuster, 2008b; Trabelsi *et al.*, 2012).

3.3 Ciclo de vida e classificação morfológica

O ciclo de vida das AVL apresenta as formas cística e trofozoítica. A forma vegetativa e metabolicamente ativa no qual alimentam-se de bactérias, algas, leveduras, ou pequenas partículas orgânicas e em condições favoráveis reproduzem-se por fissão binária simples é chamada de trofozoíto e a forma de resistência ou dormente é chamada cística. O trofozoíto pode apresentar núcleo único ou binucleado, com nucléolo proeminente, finos acantopódios que se projetam para fora da célula a partir da sua superfície ou podem estar na forma globular, variando de acordo com o gênero. Os acantopódios permitem adesão a superfícies, movimentos celulares e captura de presas. O citoplasma é granuloso e apresenta um ou mais vacúolos contráteis evidentes (Khan, 2006; Visvesvara *et al.*, 2007) (Figura 1).

Em condições precárias de nutrientes, alta osmolaridade, temperaturas extremas, mudanças extremas de pH, as AVL adquirem a forma cística com uma estrutura de dupla parede (o endocisto parede interna e o ectocisto parede externa) que possui poros que monitoram as mudanças ambientais. O processo de encistamento protege as AVL das mudanças ambientais, e até mesmo de agentes químicos utilizados para tratamento da água. Quando as condições do meio são ótimas para seu crescimento os cistos voltam à forma de trofozoíto, processo chamado desencistamento (Trabelsi *et al.*, 2012; Trabelsi *et al.*, 2015).

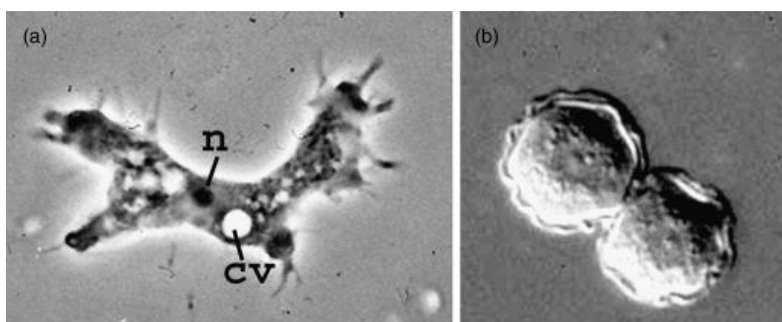


Figura 1: Trofozoítos (a) e cistos (b) de *Acanthamoeba*. As letras “n” e “cv”, representam o núcleo e vacúolo contrátil. Aumento de 1000 X. Visvesvara *et al.*, 2007.

Entre as AVL *Naegleria fowleri* apresenta em seu ciclo de vida as formas de trofozoíto (10-25 μm), cisto (8-20 μm) e uma forma transitória flagelada (10-16 μm) (figura 2) (Trabelsi *et al.*, 2012).

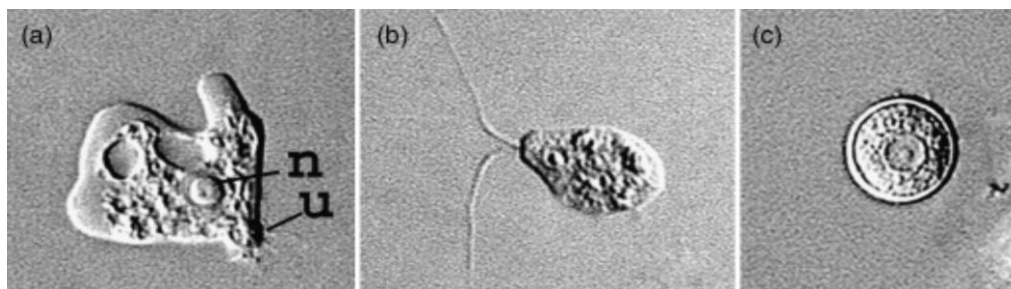


Figura 2: Imagem de *Naegleria fowleri*; (a) trofozoíto, (b) estágio flagelado e (c) cisto. Todas imagens x1000. Visvesvara *et al.*, 2007.

3.4 Principais gêneros de AVL

3.4.1 Gênero *Acanthamoeba*

Em 1930 *Acanthamoeba* foi reportada pela primeira vez, quando Castelani observou a presença de uma ameba em cultivo de *Cryptococcus pararoseus*, mas somente em 1931 seu gênero foi estabelecido. Em 1958, surgiram os primeiros indícios que *Acanthamoeba* poderia causar patologias em seres humanos, durante os ensaios para desenvolvimento de uma vacina para poliomielite, que após inoculadas em modelos animais ocasionaram a morte destes por encefalite atribuída a amebas do gênero *Acanthamoeba*. O primeiro relato da *Acanthamoeba* como agente causador de doença em humanos foi em 1972 (Visvesvara, 1991; Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Castrillón & Orozco, 2013).

Baseado em critérios morfológicos estabelecidos por Page (1988) várias espécies de *Acanthamoeba* foram descritas. Pussard & Pons (1997) classificaram espécies do gênero *Acanthamoeba* em 3 grupos, pelas características morfológicas dos cistos, como forma e tamanho (Figura 3). O grupo I têm cistos grandes (16-30 μm), com endocisto estrelado e ectocisto mais ou menos esférico. Estão inclusas nesse grupo *A. atronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata*, entre outras. O grupo II apresenta tamanho médio de 18 μm , o endocisto pode ser estrelado, oval ou triangular e o ectocisto segue o mesmo contorno do endocisto, porém levemente enrugado. É importante ressaltar que nesse grupo encontram-se espécies comumente isoladas no ambiente como *A. castellani*, *A. polyphaga*, *A. quina*, entre outras. Amebas pertencentes ao grupo III apresentam tamanho menor ou igual a 18 μm , endocisto arredondado ou globuloso e ectocisto levemente enrugado, às vezes é difícil de ser observado por localizar-se justaposto ao endocisto. Estão presentes nesse grupo;

A. lenticulata, *A. culbertsoni*, *A. royreba*, entre outras (Sthoard *et al.*, 1998; Khan, 2006; Visvesvara & Schuster, 2008a; Lorenzo-Morales *et al.*, 2015).

Atualmente a classificação mais utilizada e aceita baseia-se em sequências do gene 18S rDNA, que permitiu a identificação de cerca de 20 genótipos (T1-T20), exibindo 5% ou mais de divergência entre si. O genótipo T4 está associado à maioria das infecções humanas ocasionadas por *Acanthamoeba*, esse genótipo é responsável por cerca de 90% dos casos de ceratite amebiana por *Acanthamoeba*. Do mesmo modo, T4 é o principal genótipo associado às infecções ocasionadas por esse protozoário. Embora o genótipo T4 seja o mais comum nas infecções humanas, os fatores que determinam se uma espécie ou cepa é inofensiva ou potencialmente patogênica não foram completamente elucidados (Becker-Finco *et al.*, 2012; Siddiqui & Khan, 2012; Corsaro *et al.*, 2015).

Entre as infecções mais comuns produzidas por *Acanthamoeba* spp., estão a ceratite amebiana por *Acanthamoeba*, encefalite amebiana granulomatosa (EAG) e infecções cutâneas disseminadas. Os processos relacionados à patogenicidade de *Acanthamoeba* são complexos, pois envolvem uma gama de proteínas como adesinas, enzimas e glicoproteínas que trabalham em conjunto, desde a adesão até a instalação do processo infeccioso (Visvesvara *et al.*, 2007; Castrillón & Orozco, 2013).

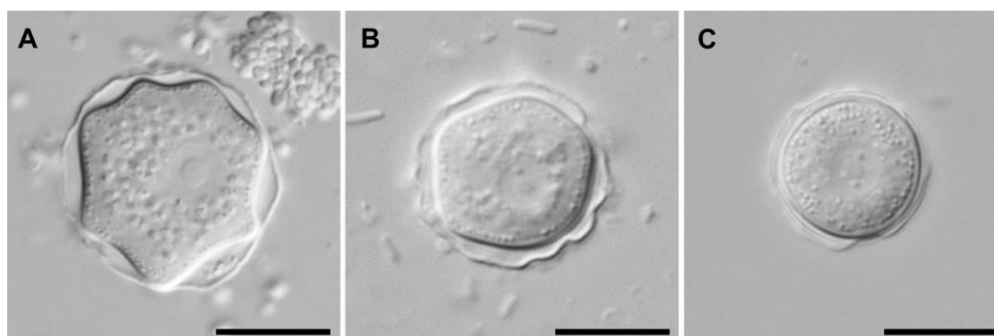


Figura 3: Cistos de *Acanthamoeba* em microscopia contraste de fase A) grupo I, (B) grupo II, (C) grupo III e suas respectivas morfologias. Barra 10µm. Lorenzo-Morales *et al.*, 2015

3.4.2 Gênero *Naegleria*

Amebas do gênero *Naegleria* são anfizóicas devido à capacidade de viverem como microrganismos de vida livre ou atuarem como parasitas. Entre as 30 espécies de *Naegleria*, somente a espécie *Naegleria fowleri* é considerada patogênica, conhecida por ocasionar meningoencefalite amebiana primária (MAP). O gênero foi identificado em 1899

por Schardinger, que o chamou de "*Amoeba gruberi*". Em 1912, Alexeieff sugeriu o nome *Naegleria*. Mais tarde, em 1970, Carter identificou *Naegleria fowleri* como agente causador de uma infecção fatal no sistema nervoso central (SNC) em humanos (Visvesvara & Schuster, 2008a; Siddiqui & Khan, 2012).

Naegleria fowleri é termofílica e pode tolerar temperaturas de até 45°C, proliferando-se frequentemente nos meses mais quentes do ano. A capacidade de tolerar altas temperaturas não é um fator para determinar sua patogenicidade. *Naegleria lovaniensis* por exemplo, é termotolerante, mas não apresentou patogenicidade em animais modelos de estudos de MAP (Schuster & Visvesvara, 2004; Visvesvara *et al.*, 2007; Siddiqui & Khan, 2014).

A MAP é uma doença grave, apresenta evolução clínica rápida, aguda, hemorrágica e fulminante, caracterizada por dor de cabeça, rigidez de nuca, febre (38,5°C - 41°C), alteração de comportamento, coma e frequentemente morte. A MAP deve ser suspeita em jovens e adultos saudáveis e/ou com sistema imunológico deficiente com histórico de exposição recente a fontes de água contaminadas. Após o contato inicial (piscina, mergulho, rios, lagos, águas termais) o período para o início da doença e aparecimento dos sintomas é de 5-7 dias, podendo ser de 24 horas em casos de imunossupressão (Kimble *et al.*, 2012; Siddiqui & Khan, 2014).

3.4.3 Gênero *Vermamoeba*

A família Hartmannellidae ocupa atualmente quatro posições diferentes na árvore filogenética, essa família evidentemente é parafilética, ou seja, seu ancestral mais próximo pertence a outros grupos, e sua taxonomia não está bem estabelecida. Smirnov *et al.* (2011) classificaram o gênero *Vermamoeba* anteriormente denominado de *Hartmannella*. A família Hartmannellidae inclui amebas termotolerantes como *Vermamoeba vermiformis* (*Hartmannella vermiformis*) que são comumente isoladas em fontes de água, torres de resfriamento de ar condicionado, spas e estações de distribuição de água potável (Fouque *et al.*, 2013; Watson *et al.*, 2014).

Embora a capacidade de *Vermamoeba* causar doenças tenha sido demonstrada, os mecanismos envolvidos nessas patologias, permanecem controversos. As espécies de interesse médico são *Vermamoeba rhyodes* (*Hartmannella rhyodes*) e *Vermamoeba*

vermiformis (*Hartmannella vermiformis*) (Lorenzo-Morales *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2013; Cateau *et al.*, 2014; Armand *et al.*, 2016) (Figura 4).

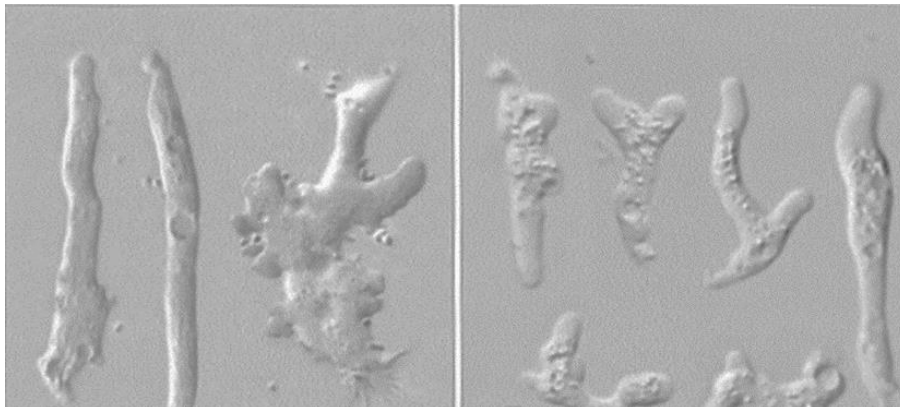


Figura 4: Trofozoítos de *Vermamoeba vermiformis* isoladas de peixe em microscopia de luz. Dyková *et al.*, 2005.

3.5 Interações entre amebas de vida livre e microrganismos

O termo “cavalo de Tróia” tem sido empregado para designar AVL que servem de reservatório para outros microrganismos intracelulares se multiplicarem, servindo assim, de veículos para disseminação de patógenos. A maioria dos isolados de AVL abrigam endossimbiontes que podem incluir vírus, fungos, protozoários e bactérias, alguns dos quais são potencialmente patogênicos para seres humanos. Em 1905, o botânico russo Konstantin Mereschkowski, descreveu cloroplastos, mitocôndrias e outras organelas como provenientes de endossimbiontes bacterianos. A natureza exata dessas relações e os benefícios para o hospedeiro, ainda não estão bem estabelecidos. Sugere-se que tais interações ajudam a transmitir endossimbiontes patogênicos para hospedeiros suscetíveis e/ou os endossimbiontes podem contribuir para a patogenicidade de certas AVL (Villajos & Simó, 2008; Taylor *et al.*, 2011; Siddiqui & Khan, 2012).

Uma vez que AVL alimentam-se basicamente de bactérias, fungos, e algas por fagocitose e a digestão ocorre dentro dos fagolissomos, alguns microrganismos evoluíram para se tornarem resistentes a esses protistas, utilizando as AVL como hospedeiros, onde sobrevivem e se reproduzem até serem liberados por meio da lise das amebas ou por liberação de vesículas cheias de microrganismos (ex. *Legionella* spp.) inaláveis, são as chamadas bactérias resistentes a amebas (BRA). Entre as bactérias patogênicas que utilizam as AVL como reservatórios estão: *Bacillus cereus*, *Bartonella* spp., *Burkholderia*

spp., *Campylobacter jejuni*, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila*, entre outras. Além disso, alguns Mimivírus e Marseillevirus, foram descobertos em AVL (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Greub & Raoult, 2004; Visvervara *et al.*, 2007; Siddiqui & Khan, 2012; Delafont *et al.*, 2013).

O mais intrigante é a capacidade que as AVL possuem de abrigar bactérias, ao mesmo tempo que alimentam-se destas no ambiente para as suas necessidades nutricionais. Tais interações são complexas e dependem tanto da virulência da ameba, como da bactéria, além das condições ambientais. O resultado destas interações complexas pode ser benéfico tanto para ameba, como para a bactéria. Interações entre bactérias e amebas podem ser transientes (no caso de bactérias intracelulares facultativas) ou estáveis (no caso de bactérias intracelulares obrigatórias) (Schmitz-Esser *et al.*, 2008; Siddiqui & Khan, 2012b).

3.5.1 Mecanismos de interação entre ameba de vida livre e microrganismos

Os mecanismos de fagocitose e digestão das AVL são semelhantes aos observados nos macrófagos. Em *Acanthamoeba*, por exemplo, bactérias são internalizadas individualmente, depois são agrupadas em um vacúolo: após a fusão com o lisossoma, forma-se um fagolisossoma. O pH ácido e enzimas lisossomais lisam as bactérias fagocitadas (figura 5). Esta semelhança sugere que amebas sirvam de modelo para estudar a interação das bactérias com células fagocíticas em humanos. Entretanto, os determinantes de virulência para a infecção e multiplicação em amebas e fagócitos humanos não parecem ser os mesmos (Harf, 1994; Bruggemann *et al.*, 2006; Miyake *et al.*, 2006; Buchrieser, 2011; Siddiqui & Khan, 2012b).

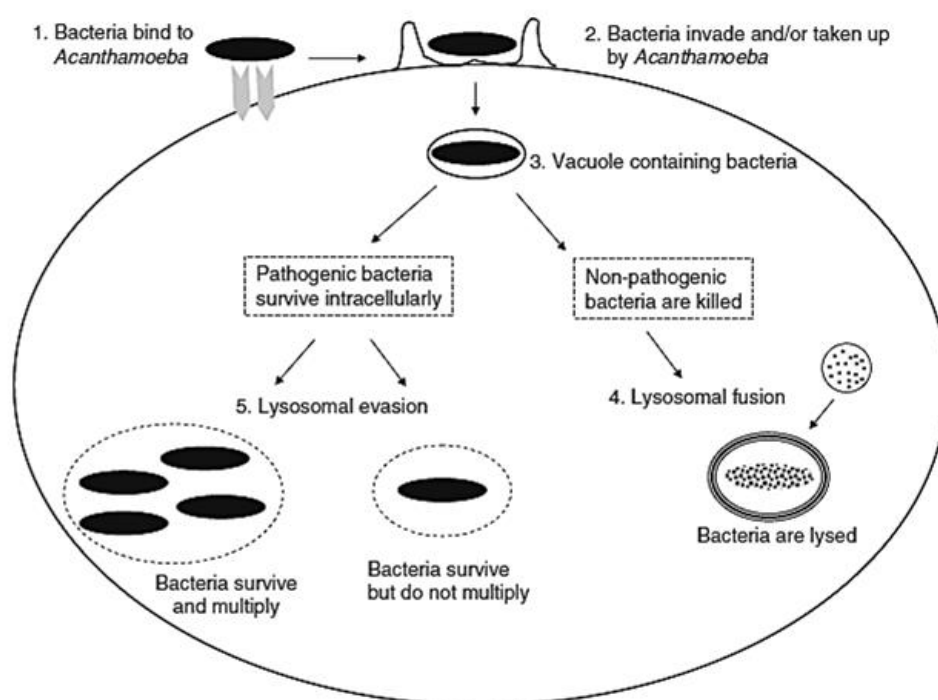


Figura 5: Invasão de bactérias em *Acanthamoeba* spp. Após internalizadas as bactérias não patogênicas são mortas e usadas como fonte de nutriente, enquanto as patogênicas modificam o mecanismo intracelular de *Acanthamoeba* spp., garantindo assim sua sobrevivência e multiplicam-se, sendo após liberadas através de vesículas, ou por lise da ameba. Algumas bactérias não se multiplicam dentro da ameba, ficam em um estado dormente, e após serem liberadas para o meio ambiente voltam ao seu estado vegetativo normal (Siddiqui & Khan, 2012b).

Entre as bactérias resistentes a amebas (BRA), algumas são intracelulares obrigatórias (*Coxiella burnetii*), enquanto outras são bactérias intracelulares facultativas (*Listeria monocytogenes*), ou até mesmo bactérias sem associação com célula eucariótica conhecida (*Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa*). Ainda, algumas são patógenos humanos estabelecidos (*Chlamydomphila pneumoniae*), enquanto outras são patógenos emergentes (*Simkania negevensis*), ou espécies não patogênicas como a (*Bradyrhizobium japonicum*) (Greub & Raoult, 2004).

Alguns estudos têm demonstrado que algumas bactérias resistentes à fagocitose pela ameba são capazes de alterar o ambiente fagossomal alguns minutos após a internalização *Legionella pneumophila* e *Pseudomonas aeruginosa*, são exemplos de bactérias que modificam o tráfego do fagossomo evitando a entrada na via endocítica do hospedeiro, impedindo a imediata fusão fagossoma-lisossoma, através da construção de um nicho distinto que permite a replicação intracelular da bactéria (Brüggemann *et al.*, 2006; Miyake *et al.*, 2006; Coombes, 2009; Schunder *et al.*, 2010; Denoncourt *et al.*, 2014; Siddiqui *et al.*, 2015).

Para evitar a digestão pelas amebas, bactérias podem expressar diferentes conjuntos de genes em resposta aos diferentes microambientes intracelulares para facilitar a sua sobrevivência e crescimento. As proteínas cuja expressão é regulada dentro dos compartimentos intracelulares podem constituir seu potencial fator de virulência (Miyake et al., 2006). Os sistemas de secreção das bactérias desempenham um papel crucial no fornecimento dos fatores bacterianos envolvidos nestes processos para os seus sítios de ação. *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, produz várias enzimas e toxinas liberadas por diferentes sistemas de secreção. O sistema de secreção tipo III (TSS) permite que a bactéria libere toxinas no interior das células, inibindo assim a fagocitose (Khan & Siddiqui, 2014; Ben Haj Khalifa et al, 2011).

O estudo de simbioses e parasitos em AVL é relativamente recente. Drozanski (1956) descreveu a presença de microrganismos intracelulares que lisam AVL. Amebas de vida livre, podem ser utilizadas como ferramenta para descobrir novas bactérias intracelulares, investigar a patogenicidade, descobrir novos fatores de virulência, estudar as interações patógeno/hospedeiro, bem como os mecanismos de dispersão e manutenção de microrganismos patogênicos no ambiente. O entendimento dessas interações deve ajudar na melhor compreensão de como alguns microrganismos evoluíram tornando-se simbioses enquanto outros evoluíram tornando-se patógenos (Greub & Raoult, 2004; Greub et al., 2014).

3.5.2 Torres de resfriamento de ar condicionado e seu papel na dispersão de microrganismos

Em muitos sistemas de refrigeração centralizados e processos industriais, gera-se calor que deve ser extraído e dissipado. Geralmente a água é utilizada como elemento de resfriamento, sendo o procedimento mais comum o emprego de uma torre de resfriamento que permite através da evaporação de uma pequena quantidade de água, transferir o calor para o ar de forma que água possa ser empregada novamente para resfriamento, devendo-se repor ao circuito apenas a parte de água perdida por evaporação (Figura 6). Em sistemas de ar condicionado, as águas dos condensadores chegam à torre de resfriamento por tubos de aço em conjunto com uma bomba de condensação. A água chega à torre com uma temperatura média de 34,5°C e após a troca de calor com o ar

atmosférico, retorna ao condensador com temperatura na faixa de 26°C (Leiria, 2004; Alfredo, 2011).



Figura 6: Imagem (a) torre de resfriamento, a água aquecida entra pela parte superior da torre e cai lentamente, a corrente de ar entra na parte inferior se deslocando contracorrente da água quente, o contato direto das correntes de água e ar faz com que o calor seja dissipado e parte da água é evaporada, e outra retorna ao circuito sendo reaproveitada. O contato com ar atmosférico é o principal fenômeno que produz seu resfriamento. Ao lado (b) bandeja de água local onde parte da água é retida e local que foi realizado a coleta das amostras de água das torres.

Geralmente, a circulação e distribuição de ar dentro de edifícios, é realizada por meio de ductos que passam por um equipamento centralizado, que compõem um sistema de filtração e refrigeração do ar. Os ductos permitem que o ar circule várias vezes dentro do próprio edifício, resultando em pouca renovação do ar e na concentração de agentes contaminantes, favorecendo assim o contato desses agentes com as pessoas que ocupam esses locais, podendo ocasionar dano à saúde desses indivíduos (Seppanen & Fisk, 2002).

Estudos têm demonstrado a colonização de torres de resfriamento de ar condicionado por diversos microrganismos, tais como bactérias, fungos, vírus e AVL, sendo consideradas fontes de disseminação de microrganismos patogênicos. Alguns fatores contribuem para o desenvolvimento de microrganismos nesses locais, como por exemplo, os componentes metálicos desses sistemas, a falta de manutenção e cuidados que levam a processos de oxidação e corrosão dos equipamentos, contribuindo para presença de íons

metálicos dissolvidos na água e para formação de biofilmes microbianos contendo protozoários que também contribuem para proliferação de bactérias patogênicas (Al-Matawah *et al.*, 2015; Canals *et al.*, 2015; Žbikowska *et al.*, 2015).

Diversos surtos de legionelose e infecções respiratórias têm sido associados a torres de resfriamento de ar condicionado. O maior surto da doença dos Legionários (449 casos confirmados) foi atribuído a torres de resfriamento de ar condicionado em um hospital na cidade de Murcia, na Espanha, em julho de 2001 (García-Fulgueiras *et al.*, 2003; Van Den Hoek *et al.*, 2006; Von Baum *et al.*, 2010; Mouchtouri *et al.*, 2010; Laganà *et al.*, 2014).

Para nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo realizado em torres de resfriamento de ar condicionado no Brasil, com o objetivo de isolar AVL e identificar as bactérias associadas a essas amebas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de desenvolvimento do projeto

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

4.2 Coletas

Um total de 36 amostras de água de torres de resfriamento de ar condicionado foram coletadas durante o período de outubro de 2014 a agosto de 2015. As amostras eram provenientes de diferentes locais de Porto Alegre/RS e da região metropolitana. Foi coletado 1L de água de torres de resfriamento de ar condicionado situadas em hospitais, centros comerciais, indústrias e centros de ensino, mediante autorização da diretoria dos edifícios através de um ofício de autorização (Apêndice A). No momento da coleta foram obtidos os parâmetros físicos e químicos da água, tais como temperatura e pH. O pH foi determinado por método colorimétrico. As amostras foram acondicionadas em isopor e transportadas até o Laboratório para processamento e análise imediatamente após a coleta.

4.3 Processamento das amostras

As amostras foram filtradas a vácuo através de uma membrana de nitrocelulose de 47mm de diâmetro e porosidade de 3 µm. Em seguida a membrana foi retirada com o auxílio de uma pinça estéril, colocada em uma placa de Petri e lavada com 2 ml de solução tampão fosfato (PBS) pH 7,2 com Tween 80 (0,2%), removendo o material com o auxílio de um raspador ("*cell scraper*"), que desprende os microrganismos da membrana. O eluato foi então transferido para microtubos e centrifugado a 250 x g durante 15 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado com 0,5 mL de solução salina de Page (NaCl, MgSO₄ .7H₂O, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, CaCl₂ .2H₂O) (Anexo A), (De Carli, 2001).

4.3.1 Isolamento de amebas de vida livre

O sedimento ressuspensionado foi transferido para placas de ágar não-nutritivo (ANN) 1,5 % (Anexo A) cobertas com uma suspensão de *Escherichia coli* (ATCC 25922)

inativadas pelo calor a 56°C/2h. As placas foram seladas com filme plástico (Parafilm®) e incubadas a 30°C por até 15 dias. Para cada amostra de água, três placas foram preparadas. As placas foram visualizadas diariamente em microscópio óptico para observar a presença de amebas de vida livre (trofozoítos e/ou cistos). As placas negativas para presença de AVL foram descartadas após o período máximo de 15 dias de observação.

4.3.2 Obtenção de culturas monoxênicas

As amostras positivas para presença de AVL, foram subcultivas até obtenção de cultura monoxênica, com a finalidade de manter os isolados e eliminar possíveis contaminantes ambientais, tais como fungos filamentosos. As áreas das placas com AVL foram marcadas com um círculo e depois abertas sob condições de esterilidade e com auxílio de uma lâmina estéril, um pedaço de ágar da área marcada foi cortado e subcultivado para nova placa de ANN (1,5%) coberto com *Escherichia coli* (ATCC 25922).

4.3.3 Clonagem celular dos isolados monoxênicos

A clonagem de cada amostra foi realizada através da técnica de diluições sucessivas. As placas com crescimento exponencial de trofozoítos, foram colocadas sobre gelo por 10 minutos, após foi adicionado 10 mL de solução salina de Page e com uma alça de platina foram realizados movimentos suaves para desprender os trofozoítos da superfície do ANN. A suspensão foi transferida para tubos tipo Falcon e centrifugadas a 250 × g durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em tampão fosfato pH 7,2 (PBS) (Anexo B) para quantificação. Após a contagem em câmara de Fuchs Rosenthal, a concentração foi ajustada para 200 trofozoítos/ml (estima-se a presença de um trofozoíto a cada 5µL). Placas de ANN foram demarcadas em quadrados de 2mm×2mm e 5 uL da suspensão foi gotejado em cada um dos quadrados, com o objetivo de semear um único trofozoíto. Após a visualização microscópica de uma única célula, o espaço demarcado era recortado e transferido para outra placa de ANN a fim de se obter um clone.

4.3.4 Estudo morfológico dos isolados de AVL

Estudo morfológico para a identificação prévia das AVL foi realizado pela observação de cistos. Para identificação de grupos do gênero *Acanthamoeba* a morfologia dos cistos foi analisada de acordo com Pussard & Pons (1977), que se baseia nas

características da dupla parede dos cistos. Essas características foram observadas em microscópio óptico, microscópio invertido e microscópio de contraste de fase. Foram medidos 10 cistos de cada isolado para obtenção de uma média aritmética e cálculo de desvio padrão.

4.3.5 Teste de exflagelação dos organismos

Possui a finalidade de identificar *Naegleria fowleri*. Após o isolamento das AVL e obtenção de culturas monoxênicas com formas trofozoíticas, adicionou-se 10 mL de água destilada estéril sobre a superfície do ágar não-nutriente para obtenção de uma suspensão de AVL. Após, a suspensão foi transferida para garrafas de cultivo celular e incubadas a 37°C. As garrafas foram examinadas a cada 30 minutos durante 4 horas em microscópio invertido para verificar a emissão de flagelos (De Carli, 2001; Silva & Rosa, 2003).

4.4 Estudo da patogenicidade de isolados de *Acanthamoeba* por testes fisiológicos de tolerância

4.4.1 Teste de Osmotolerância

Para analisar o efeito da osmolaridade no crescimento de trofozoítos de *Acanthamoeba*, placas de ágar não-nutriente (1,5%) cobertas com suspensão de *Escherichia coli* (ATCC 25922), contendo 0,5 M e 1,0 M de manitol foram utilizadas. Placas sob as mesmas condições, porém sem manitol foram usadas como controles do crescimento. Aproximadamente 1000 trofozoítos foram inoculados no centro da placa e estas foram incubadas a 30°C por até 10 dias. O crescimento dos organismos foi determinado por contagem do número de cistos e trofozoítos a uma distância de aproximadamente 20mm do ponto de inoculação. Para cada placa, cinco campos microscópicos foram quantificados (microscópio óptico, aumento de 100x). O teste foi realizado em triplicata, e cepas ATCC de *Acanthamoeba* Neff (30010) isolado ambiental e (50492) isolado clínico foram usadas como controle nesse estudo. A contagem foi realizada no décimo dia de incubação.

4.4.2 Teste de Termotolerância

Para testes de tolerância à temperatura, placas de ágar não-nutriente (1,5%)

cobertas com suspensão de *Escherichia coli* (ATCC 25922) foram utilizadas. Aproximadamente 1000 trofozoítos foram inoculados no centro das placas e estas foram incubadas a 30°C (controle de crescimento), 37°C e 42°C por 10 dias. O crescimento dos organismos foi determinado por contagem do número de cistos e trofozoítos a uma distância de aproximadamente 20 mm do ponto de inoculação. Para cada placa, cinco campos microscópicos foram quantificados (microscópico óptico, aumento de 100x) o teste foi realizado em triplicata, e cepas ATCC de *Acanthamoeba* Neff (30010) isolado ambiental e (50492) isolado clínico foram usadas como controle nesse estudo. A contagem foi realizada no décimo dia de incubação.

4.5 Identificação molecular dos Isolados

4.5.1 Extração do DNA genômico

Para a extração de DNA total dos isolados utilizou-se o *kit Wizard® Genomic DNA* (Promega). Uma quantidade inicial de 10^3 a 10^5 trofozoítos/mL de cada isolado provenientes de cultura monoxênica foram centrifugados a $13.000 \times g$ por 5 minutos e o sedimento lavado três vezes com 1 mL de tampão PBS estéril. Após as lavagens, o processo de extração foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

4.5.2 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA dos isolados de AVL foi realizada utilizando espectrofotômetro (*Nanovue®*, *GE Healthcare Life Sciences*, versão 4.0).

4.6 Confirmação dos gêneros de amebas de vida livre e bactérias por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Oligonucleotídeos específicos para cada gênero de AVL e bactérias foram utilizados para as Reações em Cadeia da Polimerase (PCR), descritos na Tabela 1.

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 μ L, contendo 20-30 ng de DNA, 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen®), 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo, tampão de reação (50 mM KCl₂, 10 mM Tris-HCl), 1,5 mM MgCl₂ e 1U de *Taq polimerase* (Invitrogen®) e água ultrapura estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore®). A mistura reacional foi incubada em um termociclador “*Proflex™ 3x32 – Well PCR System – Life*

Technologies[®] programado para uma desnaturação inicial a 94°C, durante 5 minutos. Após a desnaturação, a reação de amplificação consistiu de 35 ciclos formados pelas seguintes etapas: desnaturação a 94°C por 1 minuto, uma etapa de anelamento a 52°C por 1 minuto e uma etapa de extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final dos ciclos a reação foi mantida a 72°C por 5 minutos e resfriada a 4°C. Todas as reações de amplificação foram padronizadas de acordo com os oligonucleotídeos utilizados, adaptações foram realizadas em alguns componentes tais como: concentração do DNA, oligonucleotídeos, MgCl₂, temperatura de anelamento e número de ciclos.

O controle negativo incluiu todos os reagentes exceto DNA. Isolados de referência de *Acanthamoeba castellanii* Neff (ATCC 30010), *Naegleria* (estirpe clonal), *Vermamoeba* (estirpe clonal), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 278532) *Legionella pneumophila* (isolado clínico) e *Mycobacterium* (isolado clínico) foram utilizados como controles positivos das respectivas reações. Após, os produtos da PCR foram analisados em eletroforese, com gel de agarose a 1,2%, corado com *GelRed* (Loading Buffer 5x –1 mL – Quatro G P&D Ltda) e visualizado sob luz ultravioleta com o fotodocumentador (*Transluminator Locus - Pix Images Touch*). Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram analisados por comparação com um padrão de peso molecular de 100 pares de bases (Ludwig[®]).

Tabela1: Os oligonucleotídeos gênero-específicos utilizados para as reações com suas respectivas sequências, genes alvos, tamanhos dos fragmentos gerados, temperaturas de anelamento e referências consultadas.

Organismo Alvo	Gene alvo	Sequência 5' – 3'	Temperatura de anelamento	Tamanho do Amplicon (bp)	Fonte
Domínio bactéria	16S rDNA	fDI:CCGAATTCGTCGAC AACAGAGTTTGATCCTG GCTCAG rP2:CCCGGGATCCAAG CTTACGGCTACCTTGTT ACGACTT	55°C	1400-1500	Weisburg <i>et al.</i> , (1991); adaptado
<i>Acanthamoeba</i>	Região ASA.S1	JDP1:GGCCCAGATCGT TTACCGTGA A JDP2:TCTCACAAGCTGC TAGGGGATA	52 °C	450-500	Booton <i>et al.</i> (2005); adaptado
<i>Hartmanella</i>	18S rDNA	Hv1227F:5'- TTACGAGGTCAG GACACTGT-3' Hv1728R:5'- GACCATCCGGAG TTCTCG-3'	56°C	505	Kuiper <i>et al.</i> , (2006); adaptado
<i>Naegleria</i>	Região ITS	ITS1:GAACCTGCGTAGG GATCATT ITS2:TTTCTTTTCTCCC C TTATTA	55°C	400-453	Pelandakis <i>et al.</i> , (2000); adaptado
<i>Legionella</i>	16SrDNA	LEG225:AAGATTAGCCT GCGTCCGAT LEG858:GTCAACTTATC GCGTTTGCT	58°C	654	Miyamoto <i>et al.</i> , (1997); adaptado
<i>Pseudomonas</i>	16SrDNA	PAGSF:GACGGGTGAGT AATGCCTA PAGSR:CACTGGTGTTT CTTCCTATA	59°C	618-620	Spilker <i>et al.</i> , (2004); adaptado
<i>Mycobacterium</i>	<i>rpoB</i>	MycF:GGCAAGGTCAC CCCGAAGGG MycR:AGCGGCTGCTG GGTGATCATC	55°C	750	Simmon <i>et al.</i> , (2010); adaptado

4.6.1 Sequenciamento e análise dos fragmentos

Os produtos das PCR purificados, foram sequenciados utilizando o sequenciador ABI-Prism 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). As sequências foram registradas no banco de dados *GenBank* e comparadas com sequências nucleotídicas de cada gênero já depositados no banco de dados, utilizando o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para classificar os isolados obtidos (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento de AVL em água de reservatórios de torres de resfriamento de ar condicionado

Das 36 amostras de água coletadas dos reservatórios de torres de resfriamento de ar condicionado, 33 (91,66%) foram positivas para isolamento de AVL. Os cistos e trofozoítos foram observados uma semana após o cultivo. Os trofozoítos apresentavam nucléolo bem definido, acantopódios e vacúolos pulsáteis visíveis. Outros organismos como bactérias, fungos também estavam presentes nas amostras na etapa inicial do isolamento (Figura 7). Subcultivos foram realizados para obtenção de culturas monoxênicas a partir da técnica de seleção de áreas das placas sem contaminantes para novas placas de cultivo (Figura 8). Frequentemente as placas eram contaminadas por fungos filamentosos, dificultando a monoxenização das amostras, tornando assim o isolamento mais trabalhoso.

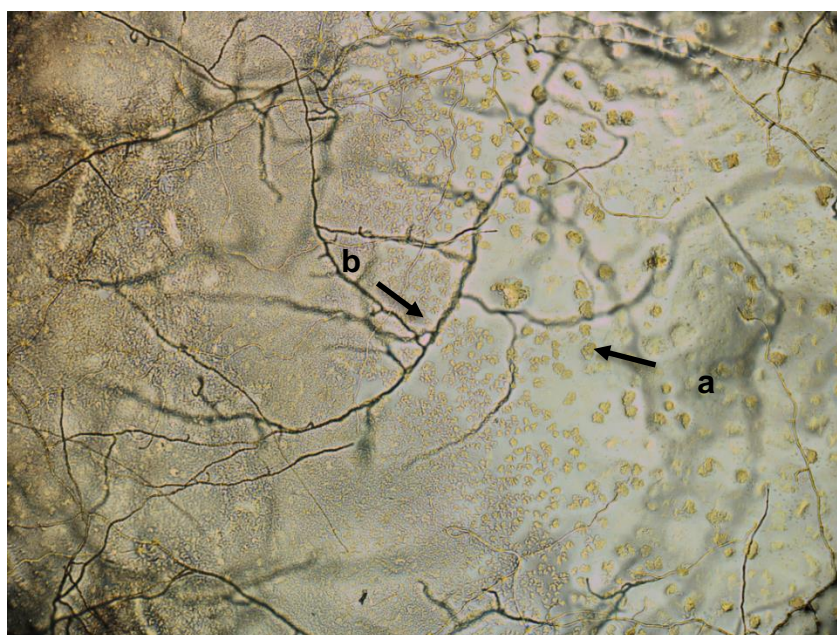


Figura 7: Placa de Ágar Não Nutriente - ANN (1,5%) coberto com *E.coli* inativada pelo calor, com crescimento de trofozoítos de AVL (a) e fungos filamentosos (b), microscópio óptico (40x).

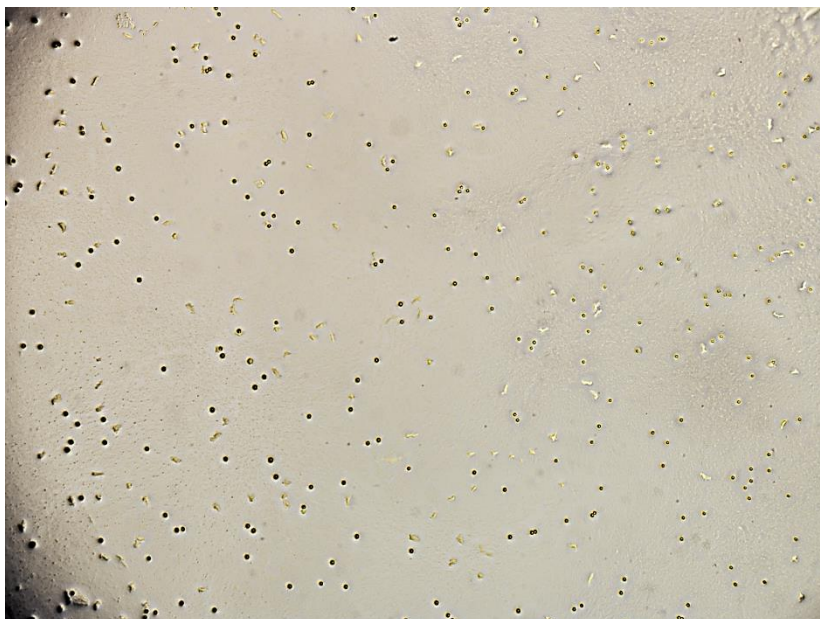


Figura 8: cistos e trofozoítos de AVL em cultivo monoxênico em ágar não nutricional (1,5%) coberto com *E.coli* inativadas pelo calor. Microscópio óptico (40X).

Amebas de vida livre são protozoários ubíquos, que têm sido isolados de diversos ambientes naturais ou artificiais, tais como; água do mar, estações de tratamento de água, torres de resfriamento de ar condicionado, unidades de lavagens dentárias, soluções de armazenamento de lentes de contato, entre outros (Moore *et al.*, 1985; De Jonckheere, 2006; Thomas *et al.*, 2008; Stockman *et al.*, 2011; Delafont *et al.*, 2013; Scheikl *et al.*, 2014).

Relatos na literatura enfatizam a dificuldade de monoxenizar e axenizar determinados isolados de AVL, principalmente de amostras ambientais. Schuster (2002), observou que a maior dificuldade no isolamento de AVL é estimular o crescimento das amebas, concomitantemente inibindo o crescimento de outros organismos contaminantes. Tsvetkova *et al.* (2004) relataram esta mesma dificuldade em amostras ambientais.

5.2 Identificação morfológica de isolados de *Acanthamoeba* spp.

Todos os isolados do gênero *Acanthamoeba* confirmados pela PCR foram classificados, através da análise de seus cistos, de acordo com os critérios estabelecidos por Pussard & Pons (1977), (tabela 2) (figura 9).

Dos 15 isolados pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*, 12 (80%) estavam de acordo com as características morfológicas do grupo II, esse grupo é o mais abundante na

natureza e inclui 11 espécies (*A. mauritanensis*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. divionensis*, *A. triangularis*, *A. lugdunensis*, *A. griffini*, *A. rhyodes*, *A. paradiunionensis* e *A. hatchetti*), 3 (20%) estavam de acordo com as características do grupo III, este grupo inclui 5 espécies (*A. palestinensis*, *A. culbertsoni*, *A. royreba*, *A. lenticulata* e *A. pustulosa*). Embora, a classificação morfológica seja considerada não confiável, devido às variações na morfologia dos cistos causadas por condições de cultura, ainda é um método bastante utilizado, principalmente com isolados ambientais. As medidas dos cistos do presente estudo foram compatíveis com o gênero *Acanthamoeba*, conforme os obtidos por Marciano-Cabral & Cabral (2003).

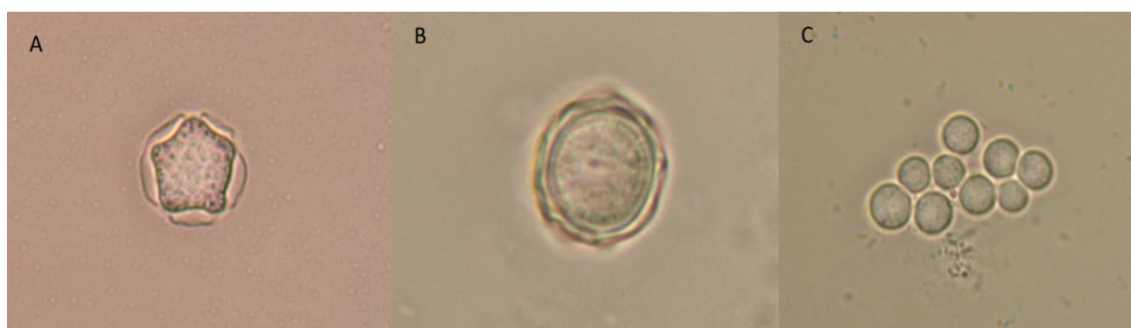


Figura 9: Cistos de *Acanthamoeba* em microscopia de contraste de fase (x1000); (A) morfologia grupo I; (B) morfologia Grupo II; (C) morfologia grupo III.

Os resultados obtidos nesse estudo são semelhantes a resultados mundialmente obtidos por outros autores que isolaram *Acanthamoeba* de amostras de ambientes naturais e artificiais como rios, lagos, poeira, piscinas, entre outros (Seal *et al.*, 2003; Lorenzo-Morales *et al.*, 2005; Caumo & Rott, 2009; Carlesso *et al.*, 2010; Landell *et al.*, 2013). No Brasil, Alves (2006) encontrou oito amostras de águas positivas para *Acanthamoeba* com morfologia similar aos grupos morfológicos II e III. Winck *et al.* (2011) obtiveram 10 isolados de *Acanthamoeba* de amostras de água de torneira, entre eles, nove foram classificados no grupo morfológico II e, apenas, um isolado no grupo morfológico III, esses estudos demonstram a prevalência ambiental do grupo II.

Tabela 2: Caracterização morfológica de *Acanthamoeba* isoladas de reservatórios de água de torres de resfriamento de ar condicionado em Porto Alegre, RS – Brasil.

Isolados	ATCC	Fontes	Média Diâmetro dos Cistos (μm) \pm DP	Grupo Morfológico (Pussard & Pons, 1977)
<i>A.Castelanii</i> Neff	30010	Solo	14,8 \pm 1,0	II
CX1		TR	12,9 \pm 0,9	II
CX2		TR	11,7 \pm 0,7	II
EC1		TR	12,0 \pm 1,3	II
EC3		TR	13,5 \pm 1,7	II
ECT1		TR	11,1 \pm 0,6	II
HSA1		TR	14,3 \pm 1,3	II
HSA2		TR	8,4 \pm 1,4	III
HSA3		TR	4,0 \pm 0,4	III
HSA4		TR	15,5 \pm 1,4	II
PT1		TR	11,9 \pm 1,1	II
SM2		TR	13,6 \pm 1,3	II
SNC1		TR	7,9 \pm 0,3	III
TAU2		TR	11,4 \pm 0,6	II
UF1		TR	14,8 \pm 0,9	II
UF2		TR	13,7 \pm 0,9	II

TR – Torre de Resfriamento; ATCC – *American Type Culture Collection*; DP – Desvio padrão.

5.3 Teste de Exflagelação

Uma das características do gênero *Naegleria*, é a capacidade de mudar a forma de trofozoíto ameboide para uma forma flagelada, com dois a três flagelos anteriores, que podem ser vistos ocasionalmente, ou podem ser emitidos por indução “*in vitro*” submetendo os isolados a condições adversas em meios com falta de nutrientes (Visvesvara & Schuster, 2008b). A transformação para fase flagelar é transitória, acredita-se que os flagelos facilitem a dispersão da ameba no ambiente em busca de nutrientes. *Naegleria* spp., tem sido identificada com base no sequenciamento de regiões internas transcritas (ITS) de rDNA, pois a habilidade de transformar-se na forma flagelada pode ser perdida (De Jonckheere, 2004; Trabelsi *et al.*, 2012). Dos 12 isolados confirmados para o gênero *Naegleria* pelo sequenciamento de DNA, todos foram negativos para o teste de exflagelação.

5.4 Estudo do potencial patogênico de *Acanthamoeba* utilizando testes de tolerância

A capacidade das AVL em produzir uma infecção está associada a diversos fatores de patogenicidade, tais como: produção de adesinas, toxinas, capacidade de resistir a fatores ambientais (alta osmolaridade, variação de temperaturas e falta de nutrientes) e

agentes quimioterapêuticos. Para simplificar, esses fatores são divididos em fatores que contribuem diretamente e indiretamente para patogenicidade das AVL (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015).

Khan *et al.* (2001) descreveram os testes de osmotolerância e termotolerância, como marcadores na diferenciação de patogenicidade de isolados de *Acanthamoeba*. Em nosso estudo, os isolados foram submetidos a duas diferentes temperaturas (37°C e 42°C) e duas diferentes concentrações molares de manitol (0,5 M e 1,0 M). Todos os isolados testados apresentaram crescimento a 37°C, bem como na concentração de 0,5 M de manitol (Tabela 3). Onze isolados cresceram na temperatura de 42°C, e dois isolados cresceram na maior concentração molar (1M) de manitol e na de temperatura mais alta (42°C), sendo considerados potencialmente patogênicos. Os isolados que cresceram a 42°C e não cresceram a 1 M de manitol, bem como os isolados que cresceram a 1 M de manitol e não cresceram a 42°C foram considerados com potencial patogênico baixo. E os isolados que não cresceram a 42°C e a 1 M de manitol foram considerados não-patogênicos.

Por ser um protozoário de vida livre *Acanthamoeba* spp. está exposta a diferentes temperaturas e pH. Da mesma forma, quando entra em contato com fluido lacrimal é exposta à alta osmolaridade (devido à salinidade das lágrimas). Para o êxito de sua patogenicidade *Acanthamoeba* spp. deve ser capaz de resistir a tais condições de estresse e exibir atividade biológica. Isolados patogênicos de *Acanthamoeba* apresentam níveis elevados de proteínas de choque térmico (HSP60 e HSP70) quando comparados a isolados não patogênicos. De acordo com Walochnik *et al.* (2000) para o desenvolvimento de uma lesão, os organismos precisam, no mínimo, sobreviver à temperatura corporal humana, 37°C.

A capacidade de *Acanthamoeba* spp. crescer a altas temperaturas e alta osmolaridade correlaciona-se com a patogenicidade dos isolados, e pode fornecer um bom indicador de seu potencial patogênico (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015; Siddiqui & Khan, 2012b; Visvesvara *et al.*, 2007). Contudo, os mecanismos pelos quais as amebas se adaptam a altas temperaturas e conseguem manter suas atividades metabólicas ainda são pouco conhecidos (Khan, 2006).

Tabela 3: Diferenciação da patogenicidade de isolados de *Acanthamoeba* spp. através de testes de tolerância

Isolados	Temperatura de Crescimento		Crescimento em Manitol		Patogenicidade
	37°C	42°C	0,5 M	1 M	
ATCC 50492	+++	++	+++	++	Potencialmente patogênico
ATCC 30010	+++	-	++	-	Não patogênico
PT1	+++	-	+	-	Não patogênico
TAU2	+++	++	+++	-	Baixo potencial patogênico
EC3	+++	+	+++	-	Baixo potencial patogênico
Cx1	+++	+	++	-	Baixo potencial patogênico
Cx2	+++	+	++	-	Baixo potencial patogênico
EC1	+++	++	+++	-	Baixo potencial patogênico
ECT1	+++	++	++	-	Baixo potencial patogênico
UF1	+++	-	+++	-	Não patogênico
UF2	+++	-	+++	-	Não patogênico
HSA1	+++	++	+++	-	Baixo potencial patogênico
HSA2	+++	+++	+++	+++	Potencialmente patogênico
HSA3	+++	+++	+++	+++	Potencialmente patogênico
HSA4	++	+	++	-	Baixo potencial patogênico
SM2	++	+	+++	-	Baixo potencial patogênico
SNC1	+++	-	+	-	Não patogênico

(-) ausência de *Acanthamoeba*, (+) 1 a 15 trofozoítos, (++) 16 a 30 trofozoítos, e (+++) >30 trofozoítos. Avaliação feita em cinco campos microscópicos (1000X).

*Critérios estabelecidos por Khan et al., 2001.

É importante ressaltar, que o fato de um isolado apresentar ou não resistência às diferentes concentrações molares do meio, nem sempre pode ser usado como critério conclusivo sobre o seu potencial patogênico. Existem outros fatores que podem ser utilizados como critério para determinar a patogenicidade de um isolado de *Acanthamoeba* (De Jonckheere *et al.*, 1977; Stevens *et al.*, 1980; Chan *et al.*, 2011).

Os isolados de referência (ATCC), usados como controles nesse ensaio, apresentaram os resultados esperados, uma vez que, *A. castellanii* Neff (30010) é um isolado ambiental não patogênico, enquanto que *A. castellanii* (50492) obtida de caso de ceratite, cresceu nas condições de temperatura 42°C e 1 M de manitol, indicando seu potencial patogênico.

Alguns trabalhos demonstraram que isolados patogênicos de *Acanthamoeba* exibem crescimento positivo em temperaturas e osmolaridade aumentadas (Khan *et al.*, 2002; De Jonckheere, 1983). Testes fenotípicos como estes podem ser úteis na diferenciação prévia de isolados ambientais correlacionados também a testes de efeito citopáticos (Khan *et al.*, 2001). O aumento da temperatura ambiental pode aumentar o crescimento de espécies termotolerantes, que podem ser melhor adaptadas a infecções

humanas e de outros mamíferos. Trabalhos relatam que isolados de *Acanthamoeba* não-virulentos e não-patogênicos são incapazes de crescer em temperaturas superiores a 37°C (Schuster, 2002; De Jonckheere, 1991; Khan *et al.*, 2001).

No presente estudo, dos 15 isolados do gênero *Acanthamoeba* 2 (13,33%) foram classificados como potencialmente patogênicos, ou seja, cresceram à concentração de 1 M de manitol e também à temperatura de 42°C, esse resultado é semelhante ao encontrado por Fabres *et al.* (2014), que estudaram 19 isolados de *Acanthamoeba* de spas e piscinas, dos quais 1 (5,26%) apresentou potencial patogênico. Já no estudo de Caumo *et al.* (2009) que avaliaram isolados de *Acanthamoeba* provenientes de piscinas da cidade de Porto Alegre, cerca de 38,46% foram classificados como potencialmente patogênicos.

5.5 Identificação molecular dos isolados de AVL

Entre os 33 isolados obtidos no presente estudo, 15 (45,4%) (CX1, CX2, EC1, EC3, ECT1, HSA1, HSA2, HSA3, HSA4, PT1, SM2, SNC1, TAU2, UF1 e UF2) foram confirmados com o uso da técnica da PCR como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*, sendo os genótipos mais prevalentes T4 e T5, conforme Tabela 4.

Tabela 4: Análise da similaridade entre as sequências parciais do gene 18S rDNA de *Acanthamoeba* dos isolados de água de reservatórios de torres de resfriamento de ar condicionado comparadas e depositadas no *GenBank*.

Isolado	Genótipo	Localização das Torres de resfriamento	Número de Acesso ao <i>GenBank</i>	Similaridade (%)	Sequências comparadas e registro no <i>GenBank</i>
Cx1	T4	Edifício público	KX246887	100%	KT892912.1, KT892909.1
Cx2	T5	Edifício público	KX246888	99%	KF962049.1, KF962050.1
EC1	T4	Centro comercial	KX246889	97%	KT892926.1, KT892925.1
EC3	T4	Centro comercial	KX246890	98%	KR074216.1, KR494237.1
ECT1	T4	Centro comercial	KX246891	99%	KR074216.1, KT735334.1
HSA1	T4	Hospital	KX246892	96%	KR780552.1, JX423604.1
HSA2	T5	Hospital	KX246893	97%	KF733238.1, KF962049.1
HSA3	T5	Hospital	KX246894	99%	KF733227.1, KJ652986.1
HSA4	T5	Hospital	KX246895	99%	KT892837.1, KF733227.1
PT1	T5	Edifício público	KX246896	98%	LC084752.1, KF962050.1
SM2	T4	Edifício público	KX246897	97%	JX423604.1, JQ408989.1
SNC1	T4	Centro de ensino	KX246898	97%	KR780546.1, JX423592.1
TAU2	T4	Indústria	KX246899	98%	KP337305.1, LC085292.1
UF1	T4	Universidade	KX246900	97%	JN585814.1, HQ833410.1
UF2	T4	Universidade	KX246901	98%	KT892910.1, HQ833414.1

Entre as AVL, espécies de *Acanthamoeba* são as mais prevalentes em amostras ambientais, incluindo diferentes tipos de fontes de águas. No estudo realizado por Trabelsi *et al.* (2015) 53,5% das amostras de água de um reservatório hospitalar foram positivas para AVL, cerca de 47,6% dessas eram pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*, sendo o genótipo T4 o mais prevalente. Mundialmente, esse genótipo é predominante em amostras ambientais e está frequentemente relacionado a casos de ceratite provocados por *Acanthamoeba* (Carlesso *et al.*, 2010; Dendana *et al.*, 2013; Kao *et al.*, 2013).

Scheikl *et al.* (2014) analisaram 129 amostras de água de torres de resfriamento de ar condicionado, das quais 79,1% foram positivas para o isolamento de AVL, sendo os gêneros *Acanthamoeba* (23,9%) seguido de *Vermamoeba* (19,4%) os de maior prevalência. Somente 2,32% das amostras foram positivas para o gênero *Naegleria*. Os genótipos de *Acanthamoeba* mais encontrados naquele estudo foram o T4 e T5, resultado semelhante ao verificado no presente estudo. Em outro estudo Magnet *et al.* (2012) analisaram 72 amostras ambientais, 87,5% destas foram positivas para o gênero *Acanthamoeba* e o genótipo T4 foi o mais encontrado.

Garcia *et al.* (2013) analisaram 83 amostras de água, 31,6% dos isolados pertenciam ao gênero *Acanthamoeba*, (9,7%) desses pertenciam ao genótipo T5, um ao genótipo T2, e outros 23 ao genótipo T4, resultado semelhante ao encontrado no presente estudo. Di Filippo *et al.* (2015) analisaram 160 amostras de águas de diferentes fontes na Itália. Destas, 28,7% foram positivas para o isolamento de AVL, onde *Acanthamoeba* spp. pertencentes aos genótipos T4 e T15 foram as mais prevalentes.

Acanthamoeba genótipo T4, predominante no estudo atual, é o mais importante agente causador de ceratite amebiana (CA), uma infecção intimamente relacionada às pessoas que fazem uso de lentes de contato gelatinosas. Vários genótipos de *Acanthamoeba*, incluindo o genótipo T4, podem provocar também a encefalite amebiana granulomatosa (EAG). O genótipo T5 também identificado em nosso estudo, tem sido frequentemente isolado em amostras de águas, além de estar associado, não raras vezes, a casos de ceratite (Lovieno *et al.*, 2010; Lorenzo-Morales *et al.*, 2011).

Doze isolados de AVL (36,3%) do presente estudo foram confirmados pela técnica de PCR como pertencentes ao gênero *Naegleria* (FAR2, UFT2, HSA5, ECT2, FAR1, PF2, PT2, EC2, SM1, ECT3, TAU4, UFT1) Tabela 5.

Naegleria spp. são ubíquas em ambientes aquáticos artificiais e naturais, sendo isoladas de rios, lagos, piscinas, spas, torres de resfriamento de ar condicionado, entre outros (Huang *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Canals *et al.*, 2015). Atualmente, existem mais de 30 espécies do gênero *Naegleria*, classificadas por técnicas moleculares. Destas, *N. fowleri* é a espécie mais virulenta, responsável pela meningoencefalite amebiana primária (MAP), uma doença rara, mas frequentemente fatal, cuja transmissão está associada à exposição de indivíduos saudáveis ou imunodeficientes a fontes de águas contaminadas.

Tabela 5: Máxima porcentagem de similaridade encontrada entre as sequências obtidas através da PCR para gênero *Naegleria* spp., e as sequências publicadas no GenBank.

Isolado	Localização das Torres de resfriamento	Número de Acesso ao GenBank	Similaridade (%)	Sequências comparadas e registro no GenBank
FAR2	Indústria	KX246875	93%	JF317336.1, KC820648.1
UFT2	Universidade	KX246876	91%	JX294421.1, AB128053.1
HSA5	Hospital	KX246877	99%	AM062730.1, HQ738333.1
ECT2	Centro comercial	KX246878	99%	KC820645.1, JQ678643.1
FAR1	Edifício público	KX246879	99%	AB332171.1, JQ678643.1
PF2	Edifício público	KX246880	99%	JF317336.1, AB332153.1
PT2	Edifício público	KX246881	99%	JF317336.1, JX96578.1
EC2	Centro comercial	KX246882	99%	JX267141.1, AJ566633.1
SM1	Edifício público	KX246883	97%	<i>Naegleria australiensis</i> GU597026.1, GU597035.1
ECT3	Centro comercial	KX246884	98%	<i>Naegleria australiensis</i> GU597030.1, GU597027.1
TAU4	Indústria	KX246885	99%	AM418424.1, JF317336.1
UFT1	Universidade	KX246886	99%	AB332152.1, JF317336.1

Embora as sequências não tenham apresentado similaridade com a espécie *Naegleria fowleri*, duas amostras apresentaram similaridade de 97% e 98% com sequências depositadas para espécie *Naegleria australiensis*. Mesmo não havendo relatos de meningoencefalites provocadas por essa espécie, De Jonckheere *et al.* (1983) demonstraram sua patogenicidade em um estudo de infecção experimental em ratos, com envolvimento da mucosa nasal, neuroepitélio olfativo e cérebro. Embora as alterações histopatológicas difiram daquelas produzidas por *N. fowleri*, especialmente quanto ao grau

de gravidade, elas podem levar à encefalite crônica ou subaguda e com um curso clínico prolongado.

Espécies do gênero *Naegleria* podem representar uma ameaça adicional à saúde humana, uma vez que podem servir de reservatórios para multiplicação e dispersão de bactérias, incluindo espécies patogênicas e não-patogênicas (Greub & Raoult, 2004). Huang & Hsu (2010) analisaram 106 amostras de águas coletadas de diferentes fontes artificiais, dessas 14,2% foram positivas para o gênero *Naegleria* sendo a maioria de fontes aquecidas. Garcia *et al.* (2013) analisaram 83 amostras de água, dessas 13 isolados (13,2%) corresponderam ao gênero *Naegleria*.

No estudo realizado por Corsaro *et al.* (2010) três sistemas de tratamento de água foram analisados, o gênero prevalente foi *Naegleria* com 16 isolados (44,4%), seguido de *Acanthamoeba* com 9 isolados (25%) e *Vermamoeba* (*Hartmannella*) com 5 isolados (13,8%). Esses resultados demonstram a ampla dispersão desses protozoários de vida livre em ambientes aquáticos, principalmente em fontes aquecidas. *Naegleria* spp. são termotolerantes e proliferam quando a temperatura do ambiente é maior que 30°C. A temperatura média da água de dos reservatórios de torres de resfriamento é 34,6 °C o que fornece condições favoráveis para seu desenvolvimento. Embora algumas pesquisas tenham concluído que *N. fowleri* é comumente encontrada em amostras ambientais, principalmente em regiões quentes, no Brasil *N. fowleri* é raramente reportada.

Seis (18,2%) dos isolados do presente estudo foram identificados como *Vermamoeba* (SMV1, SMV2, TAU2, TAU3, PF1 e SNC2) (Tabela 6). A similaridade dos isolados com as sequências da mesma região gênica foi maior igual 96% para espécies dentro do gênero *Vermamoeba*. Todos isolados de *Vermamoeba* spp. tiveram similaridade de 96% a 99% com a espécie *Vermamoeba vermiformis* oriundas de ambientes aquáticos.

Tabela 6: Máxima porcentagem de similaridade encontrada entre as sequências obtidas através da PCR para *Vermamoeba vermiformis*, e as sequências publicadas no *GenBank*.

Isolado	Localização das Torres de resfriamento	Número de Acesso ao <i>GenBank</i>	Similaridade (%)	Sequências comparadas e registro no <i>GenBank</i>
PF1	Edifício público	KX247625	96%	KC161965.1, GQ861571.1
SNC2	Centro de ensino	KX247626	97%	KJ000408.1, DQ407552.1
SMV1	Edifício público	KX247627	97%	KC161965.1, AY502961.1
SMV2	Edifício público	KX247628	97%	DQ407572.1, DQ123623.2
TAU2	Indústria	KX247629	98%	DQ407566.1, AY502961.1
TAU3	Indústria	KX247630	99%	KC188996.1, AY502960.1

Coşkun et al. (2013) analisaram 150 amostras de água da torneira, 33% das amostras foram positivas para isolamento de AVL, dessas 72,72% foram positivas para *Vermamoeba vermiformis* e os outros 27,27% eram pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*. Algumas cepas de *Vermamoeba* são termotolerantes e resistem a temperaturas superiores a 42°C. Fields et al. (1990) demonstraram o papel dessas amebas como vetores de bactérias patogênicas do gênero *Legionella*. Também tem sido relatado que elas servem de hospedeiros para *Pseudomonas*, consideradas agentes patogênicos mais importantes dos olhos em usuários de lentes de contato (Mah-Sadorra et al., 2005; Armand et al., 2015). Lorenzo-Morales et al. (2007) relataram o primeiro caso de ceratite por infecção mista *Acanthamoeba* e *Vermamoeba (Hartmannella)*, em uma paciente usuária de lentes de contato. O diagnóstico rápido foi realizado por PCR e a patogencidade dos isolados foi comprovada por meio de estudo citopáticos.

Hsu et al. (2011) analisaram 160 amostras ambientais e a prevalência dos gêneros isolados seguiram a seguinte ordem: *Acanthamoeba* spp. 25%, *Vermamoeba* 43,8%, *Naegleria* 26,3% e *Vahlkampfia* 24,4%. Estudos realizados em diversos países têm comumente encontrado esses quatro gêneros em amostras ambientais (Schuster & Visvesvara, 2004; Edagawa et al., 2010; Huang et al., 2011; Ji et al., 2014; Armand et al., 2015), corroborando os achados do presente estudo que também identificou os gêneros *Acanthamoeba*, *Naegleria* e *Vermamoeba*.

5.6 Identificação de endossimbiontes nos isolados de AVL

Para prévia caracterização dos isolados, quanto à presença ou ausência de endossimbiontes, foram utilizados oligonucleotídeos que amplificam a região 16S rRNA do domínio Bacteria. A partir desse critério, constatamos que dos 33 isolados de AVL, 13 (39,3%) foram positivos para presença de endossimbiontes. A utilização de oligonucleotídeos como “screening”, que amplificam regiões comuns a todos os procariotos, possibilitam identificar microrganismos incultiváveis e taxonomicamente não caracterizados.

Choi et al. (2009) encontraram uma prevalência de 29,4% de endossimbiontes em isolados de amebas do gênero *Acanthamoeba* provenientes de água da torneira. Schimitz-Esser et al. (2008) analisaram 10 isolados de *Acanthamoeba* spp. de origem

ambiental e constataram a presença de endossimbiontes em 80% dos seus isolados. Fritsche *et al.* (1993) analisaram amostras clínicas e ambientais, e constataram que cerca de 24% de seus isolados eram positivos para presença de endossimbiontes, resultados semelhantes ao encontrando no presente estudo.

Amebas de vida livre têm sido descritas como reservatórios para bactérias patogênicas. As mais estudadas são *L. pneumophila*, micobactérias não tuberculosas e *P. aeruginosa*, as quais são consideradas patógenos bacterianos oportunistas mais relevantes ligados a doenças relacionadas com a água. *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus* também têm sido implicadas em infecções nosocomiais (Cateau *et al.*, 2014). Os endossimbiontes, mais comuns de AVL pertencem a três classes Alphaproteobacteria, Gamaproteobacteria e Actinobacteria (Delafont *et al.*, 2013; Denoncourt *et al.*, 2014).

Após a confirmação de endossimbiontes nos isolados de AVL, oligonucleotídeos para os principais grupos de simbioses foram utilizados para sua possível identificação. Os oligonucleotídeos para as famílias *Legionellaceae* e *Mycobacteriaceae*, utilizados no presente trabalho, apesar dos seus respectivos controles apresentarem os resultados esperados, não apresentaram amplificação. Entretanto, quando foram utilizados oligonucleotídeos específicos para *Pseudomonas* spp., todos os isolados foram positivos (Tabela 7).

Pseudomonas spp. são bactérias gram negativas, encontradas em uma grande variedade de habitats, incluindo solo e ambientes aquáticos. Como um agente patogênico oportunista, é capaz de causar uma variedade de infecções em seres humanos e é notável como a principal causa de pneumonia crônica em pacientes com fibrose cística. Além de seres humanos, *Pseudomonas* spp. infecta outros organismos, incluindo nematoides, plantas, insetos e amebas de vida livres (Lee *et al.*, 2011).

Embora a espécie *Pseudomonas aeruginosa*, seja responsável por grande parte das infecções em seres humanos, outras espécies têm despertado interesse médico, devido a relatos de infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos, principalmente, pacientes acamados. *Pseudomonas putida* encontrada no presente estudo, faz parte do grupo de *Pseudomonas* fluorescentes encontradas nos mais variados ambientes. Essas bactérias têm sido documentadas por provocarem bacteremia e pneumonia em pacientes hospitalizados que fazem uso de cateter (Thomas *et al.*, 2013).

Tabela7: Máxima porcentagem de similaridade encontrada entre as sequências obtidas através do sequenciamento dos produtos da PCR para gênero *Pseudomonas* spp. e as sequências públicas do *Genbank* (banco de sequências nucleotídicas do NCBI).

Isolados de AVL	Localização das Torres de resfriamento	Similaridade no BLAST	Nº de acesso no Genbank	Espécies comparadas e número de acesso no Genbank
TAU2 (<i>Vermamoeba</i>)	Indústria	98%	KX246862	<i>Pseudomonas putida</i> KU570344.1, KT380608.1
HSA2 (<i>Acanthamoeba</i>)	Hospital	99%	KX246863	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. KF851237.1, KF785433.1
FAR1 (<i>Naegleria</i>)	Edifício pública	96%	KX246864	<i>Pseudomonas</i> sp. KP125983.1, KF295801.1
ECT1 (<i>Acanthamoeba</i>)	Centro comercial	96%	KX246865	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. KX242391.1, LN563999.1
HSA3 (<i>Acanthamoeba</i>)	Hospital	98%	KX246866	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KM538944.1, KF053342.1
UFT2 (<i>Naegleria</i>)	Universidade	99%	KX246867	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. KM656366.1, KM656387.1
PT1 (<i>Acanthamoeba</i>)	Edifício público	99%	KX246868	<i>Pseudomonas</i> sp. KM021093.1, KM021164.1
CX2 (<i>Acanthamoeba</i>)	Edifício público	99%	KX246869	<i>Pseudomonas</i> sp. KP966460.1, KM021133.1
HSA1 (<i>Acanthamoeba</i>)	Hospital	98%	KX246870	<i>Pseudomonas</i> sp. KR189780.1, KP238221.1
ECT2 (<i>Naegleria</i>)	Centro comercial	98%	KX246871	<i>Pseudomonas putida</i> KX238999.1, KU570344.1
SM2 (<i>Acanthamoeba</i>)	Edifício público	99%	KX246872	<i>Pseudomonas fluorescens</i> KJ381103.1, KJ381137.1
UF1 (<i>Acanthamoeba</i>)	Universidade	99%	KX246873	<i>Pseudomonas</i> sp. KJ806215.1, KM114957.1
ECT3 (<i>Naegleria</i>)	Edifício público	99%	KX246874	Uncultured <i>Pseudomonas</i> AB849322.1, AB849313.1

Pseudomonas fluorescens outra espécie identificada no presente estudo, não é considerada um agente patogênico de seres humanos. No entanto, estudos “in vitro” demonstram que *P. fluorescens* possuem uma série de características funcionais que lhe conferem a capacidade de se desenvolverem em hospedeiros mamíferos. Embora não sejam suspeitas de serem agente etiológico de doença pulmonar, há relatos identificando-as em amostras respiratórias. Há também uma associação intrigante entre portadores da

doença de Crohn e *P. fluorescens*, pois aproximadamente 50% dos pacientes com doença de Crohn desenvolvem anticorpos séricos para *P. fluorescens* (Scales *et al.*, 2014).

Calvo *et al.* (2013) analisaram 72 isolados amebianos de diversas fontes de água e os endossimbiontes prevalentes foram *Mycobacterium* spp. (36,9%) e *Pseudomonas* spp. (26,1%). Bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. têm sido reportadas por estar envolvidas em casos de ceratite em usuários de lentes de contato associada a amebas do gênero *Acanthamoeba* (Simmons *et al.*, 1998).

Garcia *et al.* (2013) analisaram 43 isolados de AVL para detectar a presença de bactérias intracelulares, 38 (88,4%) isolados AVL foram positivos para os três gêneros analisados. *L. pneumophila* foi detectada em 13,9% dos isolados (6/43), *Pseudomonas* spp. em 32,6% (14/43) seguido de *Mycobacterium* spp. 41,9% (18/43). Pesquisas realizadas por Walser *et al.* (2014) demonstraram que aerossóis de água de torres de resfriamento de ar condicionado estão frequentemente contaminadas com microrganismos, incluindo espécies de *Legionella* (cerca de 13%) e de *Pseudomonas* spp. (cerca de 32%).

Maschio *et al.* (2015) analisaram 12 isolados de AVL isoladas de ar condicionado e estojos de lentes de contato 100% (12/12) apresentaram *Pseudomonas* spp. como endossimbionte.

Em estudo realizado por Lovieno *et al.* (2010) foram avaliados 37 isolados de AVL, oriundos de amostras clínicas. Destes, 22 apresentavam endossimbiontes, dos quais 13 pertenciam ao gênero *Pseudomonas*.

Niyyati *et al.* (2015) analisaram 75 amostras de águas recreacionais, 16 (21,3%) foram positivas para o gênero *Acanthamoeba* e os genótipos T4 e T5 foram os mais prevalentes. Destes, 5 isolados (35,7%) foram positivos para endossimbiontes, com maior prevalência para *Pseudomonas aeruginosa*.

Na natureza provavelmente, AVL alimentam-se de *Pseudomonas* spp. que estão amplamente distribuídas em ambientes aquáticos. Algumas espécies de *Pseudomonas* evoluíram para tornar-se resistentes à fagocitose pelas AVL, o que têm sido demonstrados pelo isolamento de *Acanthamoeba*, *Vermamoeba* e *Naegleria* naturalmente infectadas com *Pseudomonas* spp. (Greub & Raoult, 2004). No entanto, se existe uma relação entre a patogenicidade de *Pseudomonas* spp. e sua capacidade de resistir a fagocitose por AVL, isso permanece ainda por ser determinado (Cateau *et al.*, 2014).

No Brasil não há uma legislação específica para o tratamento das águas de torres de resfriamento, como ocorre nos países da Europa. A resolução nº 9, de 16 de janeiro de 2003, estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), trata dos padrões referenciais de qualidade do ar interior em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo, cujo desequilíbrio pode causar danos à saúde dos seus ocupantes. Esta resolução preconiza que o valor máximo recomendável (VMR) para contaminação microbiológica deve ser ≤ 750 UFC/m³ de fungos, para a relação I/E onde, I é a quantidade de fungos no ambiente interno e E é a quantidade de fungos no ambiente externo. Estabelece ainda os valores máximos recomendáveis de contaminação química, como dióxido de carbono, entretanto não estabelece critérios para bactérias como *Legionella*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, entre outras.

A portaria nº 3.523, de 28 de agosto de 1998, do Ministério da saúde (MS) estabelece medidas básicas referentes aos procedimentos de verificação visual do estado de limpeza, remoção de sujidades por métodos físicos e manutenção do estado de integridade e eficiência de todos os componentes dos sistemas de climatização, para garantir a qualidade do ar. Essa portaria estabelece os procedimentos de limpeza dos filtros, serpentinas, dutos, remoção de corrosão e biofilmes por meios físicos.

Nos últimos anos, estudos têm sido realizados para demonstrar que AVL são resistentes aos processos de tratamento da água. Algumas das bactérias presentes nas amebas também são resistentes a esse processo. *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp. têm sido documentadas como resistentes aos processos de tratamento de água (Thomas *et al.*, 2010). Acredita-se que uma vez abrigados nas amebas, esses microrganismos não sofram ação dos agentes químicos utilizados no tratamento das águas, pois as amebas serviriam como barreiras de proteção (Greub & Rauolt, 2004; Srikanth & Berk, 1998).

Os tratamentos químicos aplicados às torres de resfriamento incluem biocidas para inibir o crescimento de microrganismos, dispersantes e inibidores de corrosão. Os biocidas podem ser não-oxidantes nos quais incluem-se tiocianatos, tiocarbamatos e compostos de amônio quaternários. Já os compostos oxidantes incluem peróxido de hidrogênio, cloro, monocloramina, entre outros (Critchley & Bentham, 2007).

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2007) sugere uma abordagem de análise de risco através da implementação de planos de segurança de água para controlar o risco de infecção provocado por torres de resfriamento, que devem ser específicos para

desinfecção, monitoramento e manutenção das torres de resfriamento. Embora, haja muitos relatos de surtos de legionelose em diversos países, o mais recente em Portugal com 304 casos confirmados da doença do Legionário e 5 óbitos confirmados, dados epidemiológicos constataram que a fonte da infecção foi torres de resfriamento de ar condicionado de uma indústria de adubos agrícolas (Shivaji *et al.*, 2014). No Brasil não há relatos de surtos da doença dos Legionários, provavelmente por não se tratar de uma doença de notificação compulsória.

Amebas de vida livre (AVL) estão amplamente distribuídas no ambiente, sendo isoladas mundialmente dos mais diversos habitats e consideradas importantes veículos de patógenos humanos por abrigarem bactérias endossimbiontes. O gênero *Naegleria* spp. como demonstrado nesse estudo está frequentemente associado com patógenos humanos, apesar de somente a espécie *N. fowleri* ser considerada patogênica, estudos são necessários para estabelecer o papel dessa associação na patogenicidade de outras espécies de *Naegleria*. Embora, o gênero *Vermamoeba* seja frequentemente isolado de fontes de águas, seu papel como agente patogênico ainda é controverso, mas nos últimos anos há crescentes relatos de casos de ceratite provocada por *Vermamoeba vermiformis* em associação com *Acanthamoeba* spp.

Pseudomonas spp. são frequentes em fontes de águas e sua presença pode ter grande impacto sobre indivíduos imunodeprimidos. Portanto, a sua prevalência no ambiente e sua relevância na patogenicidade humana nos levam a buscar sua ocorrência em amebas de vida livre.

6 CONCLUSÃO

No atual estudo, o gênero *Acanthamoeba* spp. foi o mais prevalente, representando 45,4% dos isolados. O genótipo T4 (o mais associados às patologias que acometem seres humanos) foi o mais encontrado. *Naegleria* spp. foi o segundo gênero mais prevalente (36,3%) entre os isolados, seguido da espécie *Vermamoeba vermiformis* correspondente a 18,2% dos isolados. Dos 33 isolados, 13 (39,3%) foram positivos para presença de bactérias associadas a amebas, sendo 100% delas pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. Como vimos no presente estudo, torres de resfriamento de ar condicionado servem de habitat para diversos protozoários de vida livre e esses de reservatórios para microrganismos patogênicos oportunistas.

Técnicas de biologia molecular, como a PCR utilizada no presente estudo, têm a sensibilidade e especificidade necessárias para identificar com precisão os gêneros de amebas de vida livre e endocitobiontes que habitam nossos ecossistemas. Os resultados obtidos nesse estudo podem servir de referência na determinação de estratégias de avaliação e gestão de riscos para a descontaminação de água dos sistemas de resfriamento de torres de ar condicionado.

7 PERSPECTIVAS

Testar biocidas frente aos isolados de AVL obtidos no presente estudo.

Identificar outros gêneros de endosimbiontes nos isolados de AVL.

Pesquisar a transferência horizontal de genes nos isolados de AVL positivos para presença de endosimbiontes

Contribuir para criação de legislação própria que regule o monitoramento das águas de torres de resfriamento de ar condicionado.

8 REFERÊNCIAS

- Adékambi T, Salah SB, Khelif M, Raoult D, Drancourt M. 2006. Survival of environmental *mycobacteria* in *Acanthamoeba polyphaga*. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:5974-5981
- Alfredo, José Carlos. 2011. Análise crítica da norma brasileira ABNT NBR 16401-1 (instalações de ar condicionado – sistemas centrais e unitários parte 1 - projeto das instalações), 16401-2 (parâmetros de conforto térmico) e 16401-3 (qualidade do ar interior). Dissertação Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte Escola de Engenharia da UFMG. p.109.
- Al-Matawah Q, Al-Zenki S, Al-Azmi A, Al-Waalan T, Al-Salameen F, Hejji AB. 2015. *Legionella* detection and subgrouping in water air-conditioning cooling tower systems in Kuwait. *Environ Sci Pollut Res Int*. 22(13):10235-41
- Alves, Daniella de Souza Mendes Moreira. 2006 Isolamento e caracterização morfológica de amebas de vida livre em amostras de solo e água de piscinas no distrito federal. Brasília. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília. 70p.
- Armand B, Motazedian MH, Asgari Q. 2016. Isolation and identification of pathogenic free-living amoeba from surface and tap water of Shiraz City using morphological and molecular methods *Parasitol Res*.115(1):63-8.
- Becker-Finco A, Costa AO, Silva SK, Ramada JS, Furst C, Stinghen AE, De Figueiredo BC, De Moura J, Alvarenga LM. 2013. Physiological, morphological, and immunochemical parameters used for the characterization of clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba*. *Parasitology*.140 (3):396-405
- Ben Haj Khalifa A, Moissenet D, Vu Thien H, Khedher M. 2011. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. *Ann Biol Clin (Paris)*. 69(4):393-403.
- Berger P, Papazian L, Drancourt M, La Scola B, Auffray J.P, Raoult D. 2006. Ameba-associated microorganisms and diagnosis of nosocomial pneumonia. *Emerging Infectious*

Disease journal. V. 12, p. 248–255.

Booton, G.C.; Visvesvara, G.S.; Byers, T.J.; Kelly, D.J.; Fuerst, P.A. 2005. Identification and Distribution of *Acanthamoeba* Species Genotypes Associated with nonkeratitis Infections. J. Clin. Microbiol., v. 43, p. 1689-1693.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 9, de 16 de janeiro de 2003. Padrões referenciais de qualidade do ar interior em Ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 3.523, de 28 de agosto de 1998. Regulamento Técnico sobre limpeza e manutenção de sistemas de climatização.

Bruggemann H, Cazalet I & Buchrieser C. 2006. Adaptation of *Legionella pneumophila* to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. Current Opinion in Microbiology. V.9:86–94

Buchrieser C. 2011. *Legionella*: from protozoa to humans. Front Microbiol. V.12; 2:182. .

Calvo L, Gregorio I, García A, Fernández MT, Goñi P, Clavel A, Peleato ML, Fillat MF. 2013. A new pentaplex-nested PCR to detect five pathogenic bacteria in free living amoebae. Water Res. 47(2):493-502.

Canals O, Serrano-Suárez A, Salvadó H, Méndez J, Cervero-Aragó S, Ruiz de Porras V, Dellundé J, Araujo R. 2015. Effect of chlorine and temperature on free-living protozoa in operational man-made water systems (cooling towers and hot sanitary water systems) in Catalonia. Environ Sci Pollut Res Int. 22(9):6610-8.

Carlesso AM, Artuso GL, Caumo K, Rott, MB. 2010. Potentially Pathogenic *Acanthamoeba* Isolated from a Hospital in Brazil. Curr. Microbiol. V. 60, p. 185-190.

Castrillón JC, Orozco LP. 2013. *Acanthamoeba* spp. as opportunistic pathogens parasites. Rev Chilena Infectol. 30(2):147-55.

Cateau E, Delafont V, Hechard Y, Rodier MH. 2014. Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections? J Hosp Infect. 87(3):131-40.

Caumo K & Rott MB. 2011. *Acanthamoeba* T3, T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. *Acta Trop. Mar.* 117(3):233-5.

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), p. 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.

Choi SH, Cho MK, Ahn SC, Lee JE, Lee JS, Kim DH, Xuan YH, Hong YC, Kong HH, Chung DI, Yu HS. 2009. Endosymbionts of *Acanthamoeba* isolated from domestic tap water in Korea. *J Parasitol.* 47(4):337-44.

Coombes BK. 2009. Type III secretion systems in symbiotic adaptation of pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Trends Microbiol.* 17 (3):89-94.

Corsaro D, Pages GS, Catalan V, Loret JF, Greub G. 2010. Biodiversity of amoebae and amoeba-associated bacteria in water treatment plants. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 213(3), 158–166.

Corsaro D, Walochnik J, Köhler M, Rott MB. 2015. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitol Res.* 114 (7):2481-90.

Coşkun KA, Özçelik S, Tutar L, Elaldı N, Tutar Y. 2013. Isolation and identification of free-living amoebae from tap water in Sivas, Turkey. *Biomed Res Int.* 2013:675145.

Critchley M. & Bentham R. 2007. *Legionella* and Protozoa in Cooling Towers: Implications for Public Health and Chemical Control. *Environmental Health V.* 7(2).

De Carli GA. 2001. *Parasitologia Clínica - Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas.* 2ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, p. 156-206.

De Jonckheere J. 1977. Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic

and nonpathogenic isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 33:751-57.

De Jonckheere J.F. 1923. Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing and taxonomy of the genus *Acanthamoeba*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, Laurence, v. 30, 701-706.

De Jonckheere JF, Aerts M, Martinez AJ. 1983. *Naegleria australiensis*: experimental meningoencephalitis in mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg*.77 (5):712-6.

De Jonckheere JF. 1991. Ecology of *Acanthamoeba*. *Reviews of Infectious Diseases*, Chicago, v.13, p 385-387.

De Jonckheere JF. 2004. Molecular definition and the ubiquity of species in the genus *Naegleria*. *Protist*. 55(1):89-103.

De Jonckheere, J.F., 2006. Isolation and molecular identification of free-living amoebae of the genus *Naegleria* from Arctic and sub-Antarctic regions. *Eur. J. Protistol*. 42, 115–123.

Delafont V, Brouke A, Bouchon D, Moulin L, Héchard Y. 2013. Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water. *Water Res*. 47(19):6958-65

Dendana F, Sellami H, Trabelsi H, Neji S, Cheikhrouhou F, Makni F, Ayadi A. 2013. *Acanthamoeba* T4 genotype associated with keratitis infections in Tunisia. *Parasitol Res*. 112(1):401–405

Denoncourt AM, Paquet VE, Charette SJ. 2014. Potential role of bacteria packaging by protozoa in the persistence and transmission of pathogenic bacteria. *Front Microbiol*. 21;5: 240.

Di Filippo MM, Santoro M, Lovreglio P, Monno R, Capolongo C, Calia C, Fumarola L, D'Alfonso R, Berrilli F, and Di Cave D. 2015. Isolation and Molecular Characterization of Free-Living Amoebae from Different Water Sources in Italy. *Int J Environ Res Public Health*.12 (4): 3417–3427.

Dyková I, Pindová Z, Fiala I, Dvoráková H, Machácková B. 2005 Fish-isolated strains of *Hartmannella vermiformis* page, 1967: morphology, phylogeny and molecular diagnosis of

the species in tissue lesions. *Folia Parasitol (Praha)*. 52(4):295-303.

Edagawa A, Kimura A, Kawabuchi-Kurata T, Kusuhara Y, Karanis P. 2010. Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. *Parasitol Res.*105(4):1109-17.

Fabres LF, Rosa Dos Santos SP, Benitez LB, Rott MB. 2016. Isolation and identification of *Acanthamoeba* spp. from thermal swimming pools and spas in Southern Brazil. *Acta Parasitol.* 1; 61(2):221-7.

Fields BS, Nerad TA, Sawyer TK, King CH, Barbaree JM, Martin WT, Morrill WE, Sanden GN. 1990. Characterization of an axenic strain of *Hartmannella vermiformis* obtained from an investigation of nosocomial legionellosis. *J Protozool* 37:581–583

Fouque E, Trouilhé MC, Thomas V, Humeau P, Héchard Y. 2014. Encystment of *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis*: Effects of environmental conditions and cell concentration. *Experimental Parasitology*. V.145

Fritsche TR, Gautom RK, Seyedirashti S, Bergeron DL, Lindquist TD. 1993. Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. *J Clin Microbiol.* 31(5):1122-6.

Garcia A, Goñi P, Cieloszyk J, Fernandez MT, Calvo-Beguería L, Rubio E, Fillat MF, Peleato ML, Clavel A. 2013. Identification of free-living amoebae and amoeba-associated bacteria from reservoirs and water treatment plants by molecular techniques. *Environ Sci Technol.* 2;47(7):3132-40.

García-Fulgueiras A, Navarro C, Fenoll D, Garcia J, Gonzalez-Diego P, Jimenez Bunuales T. 2003. Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerg Infect Dis.*9:915–21.

Goñi P, Garcia A, Cieloszyk J, Fernandez M.T, Calvo-Beguería L, Rubio E, Fillat M. F, Peleato M. L, Clavel A. 2013. Identification of Free-Living Amoebae and Amoeba-Associated Bacteria from Reservoirs and Water Treatment Plants by Molecular Techniques. *Environmental Science & Technology*. V. 47(7), p. 3132-40.

Greub G, Kebbi-Beghdadi C. 2014. Importance of amoebae as a tool to isolate amoeba-

resisting microorganisms and for their ecology and evolution: the *Chlamydia* paradigm. Environ Microbiol Rep.6 (4):309-24.

Greub G.; Raoult, D. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. Clinical Microbiology Reviews, Washington, v. 17, p. 413-433.

Harf C. 1994. Free-living amoeba: interactions with environmental pathogenic bacteria. Endocytobiosis & Cell Res. 10, 167-183.

Hsu BM, Huang CC, Chen JS, Chen NH, Huang JT. 2011. Comparison of potentially pathogenic free-living amoeba hosts by *Legionella* spp. in substrate-associated biofilms and floating biofilms from spring environments. Water Res.15; 45(16):5171-83.

Huang SW, Hsu BM, Chen NH, Huang CC, Huang KH, Chen JS, Kao PM. 2011. Isolation and identification of *Legionella* and their host amoebae from weak alkaline carbonate spring water using a culture method combined with PCR. Parasitol Res.109 (5):1233-41

Huang SW, Hsu BM, Wu SF, Fan CW, Shih FC, Lin YC, Ji DD. 2010. Water quality parameters associated with prevalence of *Legionella* in hot spring facility water bodies. Water Res 44(16):4805-11.

Huang SW, Hsu BM. 2010. Survey of *Naegleria* and its resisting bacteria-*Legionella* in hot spring water of Taiwan using molecular method. Parasitol Res. 106(6):1395-402

Lovieno A, Oechsler RA, Ledee DR, Miller D, Alfonso EC, 2010. Drug-resistant severe *Acanthamoeba* keratitis caused by rare T5 *Acanthamoeba* genotype. Eye Contact Lens 36, 183–184.

Ji WT, Hsu BM, Chang TY, Hsu TK, Kao PM, Huang KH, Tsai SF, Huang YL, Fan CW. 2014. Surveillance and evaluation of the infection risk of free-living amoebae and *Legionella* in different aquatic environments. Sci Total Environ.15; 499:212-9.

Kao PM, Chou MY, Tao CW, Huang WC, Hsu BM, Shen SM, Fan CW, Chiu YC. 2013. Diversity and Seasonal Impact of *Acanthamoeba* Species in a Subtropical Rivershed. BioMed Res Int, Article. p.8.

- Kao PM, Hsu BM, Chen CT, Huang SW, Kao ES, Chen JL, Wu NM, Ji WT. 2014. Identification and quantification of the *Acanthamoeba* species and genotypes from reservoirs in Taiwan by molecular techniques. *Acta Trop.* 132:45-50.
- Kao PM, Hsu BM, Chen NH, Huang KH, Huang SW, King KL, Chiu YC. 2012. Isolation and identification of *Acanthamoeba* species from thermal spring environments in southern Taiwan. *Exp Parasitol.* 130(4):354-8.
- 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, Siddiqui R. 2014. Predator vs aliens: bacteria interactions with *Acanthamoeba*. *Parasitology.* 141, 869–874.
- Khan NA. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology.* V.30 (4), p. 564-95.
- Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. 2006. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect.* 36(2):78-91.
- Kuiper MW, Valster RM, Wullings BA, Boonstra H, Smidt H, van der Kooij D. 2006. Quantitative detection of the free-living amoeba *Hartmannella vermiformis* in surface water by using real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 72:5750–575
- Laganà P, Caruso G, Piccione D, Giofrè ME, Pino R, Delia S. 2014. *Legionella* spp., amoebae and not-fermenting Gram-negative bacteria in an Italian university hospital water system. *Ann Agric Environ Med.* 21(3):489-93.
- Landell, MF, Salton J, Caumo K, Broetto L, Rott, MB. 2013. Isolation and genotyping of free-living environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. from bromeliads in Southern Brazil. *Experimental Parasitology.* 134, p. 290-294.
- Lee X, 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(3):268-72.

- Leiria, Luiz Emilson. 2004. Revista Climatização e Refrigeração. NTE Editorial.
- Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. 2015. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*, V. 22, p. 10.
- Lorenzo-Morales J, Martínez-Carretero E, Batista N, Alvarez-Marín J, Bahaya Y, Walochnik J, Valladares B. 2007. Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *A Parasitol Res.* 102(1):167-9.
- Lorenzo-Morales J, Morcillo-Laiz R, Martín-Navarro CM, López-Vélez R, López-Arencibia A, Arnalich-Montiel F, Maciver SK, Valladares B, Martínez-Carretero E, 2011. *Acanthamoeba* keratitis due to genotype T11 in a rigid gas per-meable contact lens wearer in Spain. *Contact Lens Anterior Eye.* 34, 83–86.
- Lorenzo-Morales J, 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.
- Magnet A, Galván AL, Fenoy S, Izquierdo F, Rueda C, Fernandez Vadillo C, Pérez-Irezábal J, Bandyopadhyay K, Visvesvara GS, da Silva AJ, del Aguila C. 2012. Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates. *Parasitol Res.* 111(1):383-92.
- Mah-Sadorra JH, Yavuz SG, Najjar DM, Laibson PR, Rapuano CJ, Cohen EJ. 2005. Trends in contact lens-related corneal ulcers. *Cornea* 24(1):51–58.
- Marciano-Cabral F & Cabral G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 16, n. 2, p. 273-307.
- Maschio VJ, Corção G, and Rott MB (2015). Identification of *Pseudomonas* spp. AS amoeba-resistant microorganisms in isolates of *Acanthamoeba*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* Jan-Feb; 57(1): 81–83.
- Miyake M, Fukui T, Imai Y. 2006. Differences in protein synthesis between wild type and intracellular growth-deficient strains of *Legionella pneumophila* in U937 and *Acanthamoeba polyphaga*. *Microb Pathog.* 40(4):161-70.

- Miyamoto H, Yamamoto H, Arima K, Fujii J, Maruta K, Izu K, Shiomori T, Yoshida S. 1997. Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of *Legionellae* in hospital cooling tower water. *Appl Environ Microbiol* 63:2489–2494
- Molmeret M, Horn M, Wagner M, Santic M, and Kwaik YA. 2005. Amoebae as Training Grounds for Intracellular Bacterial Pathogens *Appl Environ Microbiol*. 71(1): 20–28.
- Moore MB, McCulley JP, Luckenbach M, Gelender H, Newton C, McDonald MB, Visvesvara GS, 1985. *Acanthamoeba* keratitis associated with soft contact lenses. *Am. J.Ophthalmol.*100; 396–403.
- Mouchtouri VA, Goutziana G, Kremastinou J, Hadjichristodoulou C. 2010. *Legionella* species colonization in cooling towers: risk factors and assessment of control measures. *Am J Infect Control.*38 (1):50-5.
- Niyyati M, Mafi M, Haghighi A, and VALA MH. 2015. Occurrence of Potentially Pathogenic Bacterial-Endosymbionts in *Acanthamoeba* Spp. *Iran J Parasitol.* 10(2): 181–188.
- O. Seppänen, W. J. 2002. Fisk Association of ventilation system type with SBS symptoms in office workers. *International Journal of indoor Environment and health.* V.12 (2); 98–112
- Page FC. 1988. *A New Key to Freshwater and Soil Amoebae.* Freshwater Biological Association Scientific Publications, Cumbria, UK. 122p.
- Pelandakis M, Serre S, Pernin P. 2000. Analysis of the 5.8S Rrna gene and the internal transcribed spacers in *Naegleria* spp. and in *N. fowleri*. *J Eukaryot Microbiol* 47:116–121
- Pussard M, Pons R. 1977. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*, Dijon, v. 13, p. 557-598
- Scales BS, Dickson RP, LiPuma JJ, Huffnagle GB. 2014. Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. *Clin Microbiol Rev.* 27(4): 927–948.
- Scheikl U, Sommer R, Kirschner A, Rameder A, Schrammel B, Zweimüller I, Wesner W,

Hinker M, Walochnik J. 2014. Free-living amoebae (FLA) co-occurring with *legionellae* in industrial waters. *European Journal of Protistology*. 50(4): 422–429.

Schunder E, Adam P, Higa F, Remer KA, Lorenz U, Bender J, Schulz T, Flieger A, Steinert M, Heuner K. 2010. Phospholipase PlaB is a new virulence factor of *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol*. 300 (5):313-23.

Schuster F L, Visvesvara GS. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology, Oxford*, v. 34, p. 1001–1027

Schuster FL. 2002. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clinical Microbiology Reviews*. 15 (3):342-54.

Seal DV, Beattie TK, Tomlinson A, Fan D, Wong E. 2003. *Acanthamoeba* keratitis. *British Journal of Ophthalmology*. 87:516-517

Shivaji TC, Pinto S, San-Bento A, Oliveira Serra LA, Valente J, Machado J, Marques T, Carvalho L, Nogueira PJ, Nunes B, Vasconcelos P. 2014. A large community outbreak of legionnaires' disease in Vila Franca de Xira, Portugal, october to november 2014. *Eurosurveillance*, V. 9 (50)18.

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

Siddiqui R & Khan NA. 2012b. War of the microbial worlds: Who is the beneficiary in *Acanthamoeba*–bacterial interactions?. *Experimental parasitology*, v. 130, n. 4, p. 311-313.

Siddiqui R & Khan NA. 2014. Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*: an old enemy presenting new challenges. *PLoS Negl Trop Dis*. 14;8(8):e3017.

Siddiqui R, Lakhundi S, Khan NA. 2015. Interactions of *Pseudomonas aeruginosa* and *Corynebacterium* spp. with non-phagocytic brain microvascular endothelial cells and phagocytic *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitol Res*. 114:2349–2356

Silva MA, Rosa JA. 2003. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas

em poeira de hospitais. Rev. Saúde Pública, v. 37, p. 242-246.

Simmon KE, Kommedal Ø, Saebo Ø, Karlsen B, Petti CA. 2010 Simultaneous Sequence Analysis of the 16S rRNA and *rpoB* Genes by Use of RipSeq Software To Identify Mycobacterium Species. J Clin Microbiol. 48(9): 3231–3235.

Simmons PA, Tomlinson A, Seal DV. 1998. The role of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in the attachment of *Acanthamoeba* to four types of hydrogel contact lens materials. Optom. Vision Sci. 75 (12), 860–866.

Smirnov AV, Chao E, Nassonova ES, Cavalier-Smith T. 2011. A revised classification of naked lobose amoebae (Amoebozoa: lobosa). Protist 162, 545–570.

Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. 2004. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 42(5):2074-9.

Srikanth S, Berk SG. 1993. Stimulatory effect of cooling tower biocides on amoebae. Appl Environ Microbiol. 59(10):3245-9.

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.

Stockman LJ, Wright CJ, Visvesvara GS, Fields BS, Beach MJ. 2011. Prevalence of *Acanthamoeba* spp. and other free-living amoebae in household water, Ohio, USA – 1990–1992. Parasitol. Res. 108, 621–627.

Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodriguez-Zaragoza S, Dean CL, Fuerst PA, Byers TJ. 1998. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. The Journal of Eukaryotic Microbiology, Lawrence, v. 45, p. 45-54.

Taylor M, Mediannikov O, Raoult D, Greub G. 2012. Endosymbiotic bacteria associated with nematodes, ticks and amoebae. FEMS Immunol Med Microbiol. 64(1):21-31

Thomas BS, Koh OMD, Bankowski MJ. and Seto TB. 2013. A Lethal Case of *Pseudomonas*

putida Bacteremia Due to Soft Tissue Infection. *Infect Dis Clin Pract (Baltim Md)*. 21(3): 147–213.

Thomas V, Loret JF, Jousset M, Greub G. 2008. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ. Microbiol.* 10, 2728–2745.

Thomas V, McDonnell G, Denyer SP, Maillard JY 2010. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiol Rev.* May;34(3):231-59

Trabelsi H, Dendana F, Neji S, Sellami H, Cheikhrouhou F, Makni F, Ayadi A. 2015. Morphological and molecular identification of free-living amoeba isolated from hospital water in Tunisia. *Parasitology Research*. V.115 (1), p. 431-435.

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. *Pathologie Biologie*, V 60 (6), p.399-405.

Tsvetkova N, Schild M, Panaiotv S, Kurdova-Mintcheva R, Gottstein, B, Walochnik J, Aspöck H Lucas MS, Müller N. 2004. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitology Research*, Berlin, v. 92, p. 405-413.

Van Den Hoek JA, IJzerman EP, Coutinho RA. 2006. Legionella outbreak in Amsterdam: a cooling tower as the source in Dutch. *Ned Tijdschr Geneesk.* 150:1808–11.

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.

Visvesvara GS, Schuster FL. 2008a Opportunistic Free-living Amebae, Part I. *Clinical Microbiology Newsletter*, Boston, v. 30, p. 151-158.

Visvesvara GS, Schuster FL. 2008b. Opportunistic free-living amebae, Part II. *Clinical Microbiology Newsletter*, Boston, v. 30, p. 159-166.

Visvesvara GS, Sriram R, Qvarnstrom Y, Bandyopadhyay K, Da Silva AJ, Pieniazek NJ,

- Cabral GA. 2009. *Paravahlkampfia francinae* n. sp. masquerading as an agent of primary amoebic meningoencephalitis. *J Eukaryot Microbiol.* 56(4):357-66.
- Visvesvara GS. 1991. Classification of *Acanthamoeba*. *Reviews of infectious diseases*, Chicago, v. 13, p. 369-372
- Von Baum H, Harter G, Essig A, Luck C, Gonser T, Embacher A. 2010. Preliminary report: outbreak of Legionnaires' disease in the cities of Ulm and Neu-Ulm in Germany, December 2009–January 2010. *Euro Surveill.* 15:19472.
- Walochnik J, Obwaller A, Aapöck 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
- Watson PM, Sorrell SC, Brown MW. 2014. *Ptolemeba* n. gen., a novel genus of hartmannellid amoebae (Tubulinea, Amoebozoa); with an emphasis on the taxonomy of *Saccamoeba*. *The Journal Eukaryotic Microbiology.* 61(6):611-9.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 173 (2):697-703.
- Winck MA, Caumo K, Rott MB. 2011. Prevalence of *Acanthamoeba* from tap water in Rio Grande do Sul, Brazil. *Curr Microbiol.* 63(5), p. 464-469,
- World Health Organization. 2007. *Legionella* and the prevention of legionellosis. Geneva:
- Zbikowska E, Walczak M, Krawiec A. 2013. Distribution of *Legionella pneumophila* bacteria and *Naegleria* and *Hartmannella* amoebae in thermal saline baths used in balneotherapy. *Parasitol Res.* 112 (1):77-83.

9 APÊNDICES - Ofício de autorização

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Projeto de mestrado: “Biodiversidade de amebas de vida livre e bactérias associadas a amebas em reservatórios de água de torres de resfriamento”

Laboratório de Parasitologia- Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia/UFRGS -Telefone para contato: (51) 3308 3584

Aluna: Scheila Soares de Oliveira

Orientadora: Profª. Drª. Marilise Brittes Rott

A água é um habitat potencial para diversos microrganismos, dentre eles, os protozoários de vida livre. O presente trabalho tem como objetivo determinar a presença de endossimbiontes em amebas de vida livre do gênero presentes em reservatórios de água de torres de resfriamento de ar condicionado.

Vimos solicitar através deste, permissão para realização de coletas de água de reservatórios de torres de resfriamento de ar condicionado. Enfatizamos que a participação é voluntária e garantimos o **sigilo dos resultados**, os quais estarão à disposição do estabelecimento para consultas. Aguardamos a análise da solicitação e autorização para realizar as respectivas coletas.

Atenciosamente,

Assinatura do orientador

Assinatura do responsável pela autorização

10 ANEXOS

10.1 ANEXO A – Solução Salina de Page & Meio de cultura (ANN)

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 1000mL

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 15min).

Ágar não-nutriente (ANN)

100mL de solução salina de Page (1X)

1,5 g de Agar

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

10.2 ANEXO B - 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).