

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia

**Análise do co-cultivo de cepas de origem clínica e ambiental de
Acinetobacter baumannii com diferentes perfis de susceptibilidade a
antimicrobianos com *Acanthamoeba* spp.**

Gabriela Rosa da Cunha

Porto Alegre, junho de 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia

**Análise do co-cultivo de cepas de origem clínica e ambiental de
Acinetobacter baumannii com diferentes perfis de susceptibilidade a
antimicrobianos com *Acanthamoeba* spp.**

Acadêmica: Gabriela Rosa da Cunha

Orientadora: Gertrudes Corção

Co-orientadora: Marilise Brittes Rott

Porto Alegre, junho de 2010.

Dedico este trabalho ao meu pai Enio, por me incentivar a buscar e dar valor ao conhecimento, me ensinar que todo o esforço nunca é em vão e principalmente pelo apoio e amor que sempre me deu.

*Se não houver frutos,
valeu a beleza das flores;
Se não houver flores,
valeu a beleza das folhas;
Se não houver folhas,
valeu a intenção da semente.*

Henfil

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a todos os mestres que nesses 5 anos e meio de graduação me fizeram conhecer e acreditar em uma linda ciência de transformação de matérias primas em cura e alívio.

À minha orientadora, Dr^a Gertrudes Corção, por ter me acolhido desde 2006 no seu laboratório, pelos conhecimentos passados e por acreditar no meu trabalho.

À minha co-orientadora, Dr^a Marilise Brittes Rott, por suas valiosas idéias e contribuições feitas ao estudo.

A Dr^a Sílvia Dias de Oliveira, por ter me introduzido ao mundo da microbiologia, e por despertar em mim a paixão por ele.

A todos os meus queridos companheiros do Laboratório, Alessandra, Daiane, Giuliano, Natália, Carolina, Waldir, Desirèe, Lyvia, Lauren e Letícia, por todo o auxílio, apoio e amizade construída ao longo destes anos.

Gostaria de agradecer imensamente ao mestrando e amigo Ismael Pretto Sauter, sem o qual este trabalho seria inexecutável, por ser meu companheiro nas noites e finais de semana exaustivos, porém necessários para a realização destes experimentos.

Aos meus colegas de graduação, sem os quais nenhuma atividade seria tão prazerosa e os dias não teriam a mesma alegria.

Aos meus amigos, em especial Thanielle e Fernanda por tudo e por estarem sempre comigo, mesmo quando longe.

A minha família, principalmente a minha irmã Suzana, meu cunhado Marcelo e meus sobrinhos Luisa e Frederico por serem o meu porto seguro e sempre estarem ao meu lado.

Ao meu namorado Júlio, por todo amor e por tornar os meus dias mais bonitos.

ÍNDICE GERAL

1. ARTIGO	7
1.1. RESUMO	8
1.2. INTRODUÇÃO	9
1.3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
1.3.1. Seleção das cepas estudadas	11
1.3.2. Aderência a células epiteliais	12
1.3.3. Hemólise	13
1.3.4. Hemaglutinação	13
1.3.5. Sensibilidade ao soro	13
1.3.6. Co-cultivo em meio sólido	14
1.3.7. Co-cultivo em meio líquido	14
1.3.8. Análise Estatística	15
1.4. RESULTADOS	15
1.5. DISCUSSÃO	17
1.6. CONCLUSÕES	21
1.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
1.8. ANEXOS	25
1.8.1. Tabela 1	25
1.8.2. Figura 1	26
1.8.3. Figura 2	27
1.8.4. Normas para Publicação	28

1. ARTIGO:

O presente artigo foi elaborado de acordo com as normas da Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, apresentadas em anexo no final do trabalho.

Análise do co-cultivo de cepas de origem clínica e ambiental de *Acinetobacter baumannii* com diferentes perfis de susceptibilidade a antimicrobianos com *Acanthamoeba* spp.

Gabriela Rosa da Cunha¹, Ismael Pretto Sauter², Alessandra Einsfeld Ferreira³, Marilise Brittes Rott⁴, Gertrudes Corção⁵

¹Acadêmica em Farmácia, UFRGS.

²Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

³Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

⁴Professor Associado I do Departamento de Microbiologia e membro do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

⁵Professor Associado II do Departamento de Microbiologia e membro do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

Endereço para correspondência: Sarmento Leite, 500

Porto Alegre, RS, Brasil

Cep: 90050-170

Tel/Fax: 55 51 33083445

Contato por: gabriela_rosac@yahoo.com.br; corcao@ufrgs.br

1.1. RESUMO

Acinetobacter baumannii é um patógeno oportunista causador de infecções hospitalares, que pode interagir com outros microorganismos como amebas de vida livre (AVL) potencialmente patogênicas pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*, tanto no ambiente hospitalar como nos efluentes. Foram realizados testes de hemólise, hemaglutinação, aderência a células epiteliais e sensibilidade ao soro em *Acinetobacter baumannii* e estas cepas foram posteriormente co-cultivadas em meios sólido e líquido com *Acanthamoeba* spp. Todas as cepas de *Acinetobacter baumannii* foram negativas para hemólise e hemaglutinação. Quanto à sensibilidade ao soro humano, nenhuma cepa foi inibida, inclusive algumas apresentaram um aumento do crescimento em relação ao controle. Todas as cepas apresentaram aderência a células epiteliais em grau variável, tendo a maioria apresentado aderência fraca. No teste de co-cultivo em meio sólido, houve aumento do raio de crescimento amebiano em relação ao controle ($p < 0,05$) e o número de cistos de *A. polyphaga* e *A. castellanii* por campo foi correlacionado à origem das cepas bacterianas. No teste em meio líquido foi utilizada *A. castellanii* clínica e observou-se uma tendência das cepas bacterianas clínicas induzirem maior encistamento. O número de trofozoítos apresentou uma tendência a diminuir ao longo do tempo, ao contrário do número de cistos. A interação entre isolados de *Acinetobacter baumannii* com cepas de *Acanthamoeba* spp. favorece estas últimas, quando ambos organismos são de mesma origem (clínica ou ambiental), induzindo uma menor formação de cistos amebianos e também aumentando o seu crescimento.

PALAVRAS-CHAVE: *Acinetobacter baumannii*, *Acanthamoeba* spp., isolados clínicos, efluente hospitalar, interação, co-cultivo.

1.2. INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii é um cocobacilo Gram negativo, considerado um patógeno oportunista causador de infecções no trato respiratório, urinário, feridas, queimaduras e circulação sanguínea¹. Têm sido associado a surtos de infecções nosocomiais em hospitais de Porto Alegre e demais cidades do Brasil^{2,3,4}, provavelmente devido à habilidade desta bactéria acumular diversos mecanismos de resistência aos antibióticos comumente utilizados na rotina terapêutica, bem como sobreviver sob condições de dessecação por longos períodos de tempo. Ela também é facilmente transmitida por objetos contaminados utilizados rotineiramente no ambiente hospitalar⁵ e também por profissionais da saúde e pacientes, por ser habitante normal da pele em indivíduos saudáveis⁶.

Algumas características de *A. baumannii* podem aumentar a virulência das cepas envolvidas em infecções, entre estas, podemos citar a adesão às células epiteliais na presença de fímbrias e/ou polissacarídeo capsular; a alta hidrofobicidade da superfície de algumas cepas, que facilitam a aderência em próteses e cateteres; habilidade de crescer em meios deficientes em ferro por sua capacidade de captar ferro do ambiente; e a adesão a tecido da bexiga de ratos, o que pode contribuir para a patogenicidade no trato urinário ou em outros tecidos⁷.

O ambiente hospitalar, devido principalmente, ao uso indiscriminado de antimicrobianos na prática clínica, é responsável por exercer uma pressão seletiva entre as cepas bacterianas resistentes, podendo disseminá-las para o ambiente. Também pode ocorrer a interação de cepas de *A. baumannii* com amebas de vida livre (AVLs) presentes tanto no interior do ambiente hospitalar, quanto no efluente hospitalar, onde as primeiras podem vir a ser lançadas.

As AVL constituem um grupo de protozoários amplamente dispersos na natureza. A *Acanthamoeba* é um dos principais gêneros das AVL e tem habilidade de sobreviver em diversos ambientes. Já foi isolada de amostras de água da rede pública, piscinas, lagos, rios, mares, caixas d'água, reservatórios, aparelhos de ar-condicionado, esgotos, sedimentos, solo, praias, vegetais, instrumentos cirúrgicos, lentes de contatos e seus estojos e recentemente em amostras de ar atmosférico⁸. Ela pode ocorrer durante seu ciclo de vida sob as formas trofozoítica (forma metabolicamente ativa) e cística (forma de resistência). No estágio trofozoítico, a *Acanthamoeba* alimenta-se de bactérias, algas, fungos ou pequenas partículas orgânicas. A fase cística ocorre quando o trofozoíto se encontra em situações de adversidade, como deficiência nutricional do meio, dessecação, alterações no pH, alterações de temperatura e quando se encontra diante de algum agente químico agressor⁹. Supõe-se que a inserção de bactérias no mesmo ambiente que as AVLs pode levar a promoção do encistamento das mesmas, por mecanismos ainda não elucidados.

O crescimento bacteriano, quando ocorre no interior de células de outros microorganismos eucarióticos, como, por exemplo, as AVL, pode favorecer a adaptação das bactérias à células fagocíticas de mamíferos. Já tem sido amplamente demonstrado que as AVL atuam como hospedeiros ambientais para muitos patógenos intracelulares, e esses microorganismos, para infectar as células do protozoário utilizam alguns genes, também necessários para infectar células de mamíferos^{10,11}. Alguns sistemas de co-cultivo com AVL e bactérias têm sido utilizados para estudar a presença de fatores de virulência através da interação entre esses dois microorganismos¹².

O objetivo deste trabalho foi analisar a interação entre isolados clínicos e de efluente hospitalar de *Acinetobacter baumannii* com diferentes perfis de

susceptibilidade a antimicrobianos com duas espécies de *Acanthamoeba*, também provenientes de amostra clínica e do ambiente, e correlacionar essa interação com outros fatores de virulência que podem estar presentes nas células bacterianas.

1.3. MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1. Seleção das cepas estudadas

Foram analisadas 14 cepas de *Acinetobacter baumannii*, destas, sete foram isoladas de amostras de efluente hospitalar (denominadas com o prefixo EF) coletadas nos anos de 2006-2007 de três diferentes hospitais de Porto Alegre e sete cepas clínicas (identificadas através do prefixo IC) cedidas pelos laboratórios de análises clínicas dos mesmos hospitais no mesmo período. As cepas foram coletadas e identificadas em estudos anteriores e pertencem à coleção do laboratório 166 do Departamento de Microbiologia da UFRGS². As cepas foram divididas em três subgrupos de acordo com seu perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, previamente determinado, duas sensíveis a todos os antimicrobianos testados (cepas números 1 e 2), três (identificadas pelos números 3,4 e 5) multirresistentes ou MDR, sensibilidade diminuída a pelo menos um antimicrobiano de três classes diferentes, e duas cepas (identificadas pelos números 6 e 7) pan-resistentes ou PR, sensibilidade diminuída a todos os antimicrobianos testados.

Também foram selecionados para análise cepas de *Acanthamoeba polyphaga* de origem ambiental ATCC 30872 e clínica ATCC 30461 e cepas de *Acanthamoeba castellanii* de origem ambiental ATCC 30010 e clínica ATCC 50496. Estas duas espécies de *Acanthamoeba* foram selecionadas para este estudo por já existirem inúmeros trabalhos correlacionando a interação destas com outras bactérias. Os isolados

amebianos foram cultivados em meio PYG (proteose peptona, extrato de levedura e glicose) contendo antibiótico penicilina-estreptomicina na concentração de 40 µL/mL e mantidas em estufa a temperatura de 30 °C até o momento dos experimentos.

1.3.2. Aderência a células epiteliais

Células epiteliais da mucosa bucal foram coletadas através da fricção suave a superfície interna da bochecha de voluntários saudáveis com suabe estéril e posteriormente misturadas em PBS para desprendimento das células. As células foram lavadas duas vezes com PBS e em seguida adicionou-se 100 µg/mL de sulfato de gentamicina por duas horas a 37°C para matar as bactérias extracelulares. Após lavagem com PBS três vezes, as células foram suspensas à concentração de 10⁵ células/mL.

Após, 250 µL da suspensão padronizada de células epiteliais e 250 µL de uma suspensão bacteriana na concentração de 1x10⁸ UFC/mL, foram misturados por uma hora a 37°C, em agitação constante de 100 g. A mistura foi centrifugada durante 10 minutos na velocidade de 1000 g e lavada novamente com PBS para remoção das bactérias não aderidas. O pellet foi suspenso em 50 µL de PBS, pH 7.2. Com essa suspensão realizou-se o esfregaço das células em lâminas de microscópio posteriormente fixadas em metanol absoluto e coradas pelo método de Gram. A contagem das bactérias aderidas em cada célula foi realizada em microscópio óptico (aumento de 100X) e a aderência expressa pela média de células aderidas em 100 células epiteliais¹. Foi considerada aderência fraca, a presença de 20 a 49 células bacterianas em uma célula epitelial bucal; aderência média, a presença de 50-79 células bacterianas e aderência forte, a presença de mais de 80 células bacterianas por célula epitelial bucal testada.

1.3.3. Hemólise

As cepas bacterianas foram semeadas em ágar TSA acrescido de 5% sangue de carneiro e incubadas a 37°C por 24 horas. O teste foi considerado positivo para a produção de hemolisina se houvesse formação de um halo claro ao redor das colônias¹³.

1.3.4. Hemaglutinação

Os isolados foram semeados em ágar CFA por um período de 16-18h a 37°C. A partir deste crescimento, foi preparada uma suspensão na concentração de 10^{10} UFC/mL em PBS dos quais foram retirados 50 µL e misturados à mesma quantidade de uma suspensão de eritrócitos de carneiro (4% em PBS) em uma microplaca de 96 poços. Após incubação durante 30 minutos, observou-se a formação de precipitado de células no fundo do poço (resultado negativo) ou a presença de aglutinados de hemácias (resultado positivo). O controle negativo foi feito através da mistura da suspensão de eritrócitos de carneiro com PBS¹³.

1.3.5. Sensibilidade ao soro

Os isolados bacterianos foram cultivados em placas de ágar TSA e incubados a 37°C por 18 horas. Um volume de 100 µL das suspensões bacterianas (10^4 UFC/mL em PBS) foi misturado a 100 µL de soro humano, obtido de voluntários saudáveis, nas concentrações de 0,19%, 0,39%, 0,78%, 1,56%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25% e 50%, em placas de 96 poços. Após incubação por 1 hora a 37°C, alíquotas de 10 µL e 100 µL foram retiradas e semeadas em placas de ágar TSA. Após incubação por 18 horas a 37°C, o número de colônias foi determinado e comparado ao controle (apenas a suspensão de bactérias com PBS). A menor concentração de soro que causou redução maior que 90% no crescimento bacteriano foi considerada.

Os testes de hemólise, hemaglutinação, sensibilidade ao soro e aderência a células epiteliais foram adaptados do estudo realizado por SILVA e col. (2008)¹³.

1.3.6. Co-cultivo de cepas de *Acinetobacter baumannii* com *Acanthamoeba polyphaga* e *Acanthamoeba castellanii* em meio sólido

Os testes de co-cultivo em meio sólido foram realizados com cepas de origem clínica e ambiental de *Acinetobacter baumannii*, de *Acanthamoeba polyphaga* e de *Acanthamoeba castellanii*.

O teste foi realizado com uma suspensão de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL dos isolados bacterianos cultivadas em ágar TSA e uma suspensão dos isolados amebianos, em Salina de Page¹⁴. A suspensão bacteriana (1mL) foi semeada em ágar Page 1,5% e deixado até completa absorção e 5 μ L de uma suspensão contendo 5×10^5 trofozoítos de *A. polyphaga* ou *A. castellanii* foi colocada no centro da placa, a qual foi incubada por três dias a 30°C¹⁰. Como controle foi utilizado um isolado bacteriano sensível a antimicrobianos inativado durante 2 horas a temperatura de 56°C. O raio de crescimento amebiano foi medido e a contagem de trofozoítos e cistos de cinco campos de cada placa foi realizada, a fim de comparar do grau de inibição de crescimento amebiano e indução de encistamento produzido pelos isolados bacterianos clínicos e de efluente.

1.3.7. Co-cultivo de cepas de *Acinetobacter baumannii* em e *Acanthamoeba castellanii* em meio líquido

Os testes de co-cultivo em meio líquido foram realizados com cepas de origem clínica e ambiental de *Acinetobacter baumannii* e a cepa *Acanthamoeba castellanii* de origem clínica. Adicionou-se 0,5 mL de uma suspensão bacteriana de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL em salina de Page a 2,5 mL de uma suspensão de 1×10^5 trofozoítos/mL de *A. castellanii* (ATCC 50496). A mistura foi incubada sob agitação de 100 X g a 37°C durante 7 dias

sendo realizada a contagem de trofozoítos e cistos todos os dias. O controle de *Acanthamoeba castellanii* foi feito incubando apenas esta cepa nas mesmas condições anteriormente descritas.

1.3.8. Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados através do programa Bioestat versão 5.0 e testados com a utilização de ANOVA seguida de Teste de Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

1.4. RESULTADOS

Todas as cepas de *Acinetobacter baumannii* deste estudo foram negativas para os testes de hemólise e hemaglutinação. Quanto ao teste de sensibilidade ao soro humano, nenhuma cepa apresentou redução maior que 90% do crescimento bacteriano, inclusive algumas apresentaram um aumento do crescimento em relação ao controle. Isto foi observado entre as cepas de origem clínica, as duas totalmente sensíveis (IC1 e IC2), as duas MDR (IC3 e IC5) e uma PR (IC7). Entre os isolados de origem ambiental, apenas uma cepa sensível a todos os antimicrobianos (EF1) apresentou esta característica.

Os resultados obtidos para o teste de aderência a células epiteliais podem ser observados na Tabela 1. Todas as cepas de *Acinetobacter* apresentaram aderência em grau variável, sendo que a maioria apresentou aderência fraca. Convém destacar que as cepas com maior porcentagem de aderência média e forte foram as de origem clínica totalmente sensíveis (IC 1 e IC 2).

Quanto ao teste de co-cultivo em meio sólido, a avaliação do raio de crescimento amebiano mostrou que em todos os casos houve aumento do raio de crescimento e não

sua redução em relação ao controle ($p < 0,05$). Também observou-se que as cepas amebianas de *Acanthamoeba polyphaga* e *Acanthamoeba castellanii* de origem ambiental, quando em contato com *A. baumannii* de origem clínica MDR e PR, tiveram seu raio de crescimento aumentado. O mesmo foi observado quando as cepas amebianas das duas espécies de origem clínica foram colocadas com as cepas de *A. baumannii* de origem ambiental.

No mesmo teste, quanto à promoção do encistamento de *A. polyphaga* e *A. castellanii*, foi observado que a média do número de cistos por campo foi correlacionado à origem das cepas bacterianas (Figura 1A, 1B, 1C e 1D). As duas espécies de *Acanthamoeba* de origem ambiental foram mais induzidas ao encistamento pelas cepas bacterianas de origem clínica e as cepas amebianas de origem clínica encistaram mais na presença das cepas bacterianas do efluente, em ambos os casos considerando as cepas bacterianas sensíveis e as MDR. A *A. castellanii* ambiental e a *A. polyphaga* clínica não apresentaram encistamento em co-cultivo com as cepas bacterianas sensíveis de origem clínica. Em relação às cepas bacterianas pan-resistentes, as cepas amebianas se comportaram de maneira semelhante, independentemente da espécie ($p < 0,01$), todavia, as bactérias de origem clínica sempre produziram um menor encistamento nas amebas de origem ambiental.

No teste de co-cultivo em meio sólido também foi avaliado o número de trofozoítas por campo, mas não houve diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle com nenhuma das cepas amebianas testadas e a presença de trofozoítos por campo foi sempre baixa.

No teste de co-cultivo em meio líquido foi utilizado *A. castellanii* de origem clínica com todos os isolados bacterianos porque os dados observados no co-cultivo em

meio sólido com esta cepa foram mais consistentes. De uma maneira geral não houve diferenças significativas entre o número de trofozoítos e cistos para as bactérias de diferentes origens. As cepas bacterianas sensíveis, tanto de origem clínica como ambiental, produziram uma quantidade de cistos menor que o controle, ou seja, também não induziram o encistamento neste experimento. Todavia, observou-se uma tendência das cepas bacterianas de origem clínica induzir a um maior encistamento que as de origem ambiental. O número de trofozoítos apresentou uma tendência a diminuir ao longo do tempo, ao contrário do número de cistos como podemos observar no gráfico (Figura 2).

1.5. DISCUSSÃO

Bactérias Gram negativas causadores de bacteremias são mais patogênicas e resistentes ao soro que organismos causadores de outros tipos de infecção. A capacidade de todas as cepas bacterianas deste estudo apresentarem resistência a soro humano, mais especificamente, da maioria das cepas de origem clínica e de uma cepa de efluente apresentar um aumento de seu crescimento na presença de soro já foi descrito em estudos anteriores¹⁵. Esta observação reforça a hipótese de que *Acinetobacter baumannii* apresenta resistência intrínseca ao soro humano e que poucas cepas sensíveis a ele têm sido isoladas. Uma correlação significativa entre o grau de resistência de bactérias Gram negativas isoladas de sepse, a atividade lítica do sistema complemento *in vitro* e suas habilidades de invadir e sobreviver em fluídos humanos tem sido descrita. Alguns componentes bacterianos como proteínas de superfície ou externas a membrana, como os lipopolissacarídeos (LPS) e polissacarídeos capsulares (CPS), estão

relacionadas a estas características, mas pouco se sabe sobre os mecanismos de defesa do hospedeiro contra *Acinetobacter* spp¹⁵.

É possível relacionar o fenômeno de aderência a adesinas filamentosas (estruturas de fímbrias) e não filamentosas. Estruturas de fímbrias e sua participação em propriedades adesivas envolvendo fibronectinas são analisadas através de ensaios de aglutinação⁷. Nos experimentos realizados, não foi possível verificar a presença destas fímbrias através do teste de hemaglutinação, mas o teste de aderência a células epiteliais mostrou que as cepas de *Acinetobacter baumannii* apresentam algum tipo de mecanismo de aderência a células eucarióticas o qual não foi possível elucidar¹⁶.

No presente estudo, os isolados bacterianos que mais apresentaram a capacidade de aderência forte e média às células epiteliais, foram os isolados clínicos sensíveis aos antimicrobianos, que também provocaram encistamento das cepas amebianas de origem clínica em menor grau. Supõe-se assim, que a aderência dos isolados bacterianos a células eucarióticas possa favorecer a fagocitose das mesmas, podendo assim, servir de alimento para as espécies de *Acanthamoeba*, quando estes dois microorganismos encontram-se no mesmo ambiente. Porém não se observou aumento no número de trofozoítos presentes em relação ao controle no experimento com meio sólido.

Nossos resultados mostram que cepas bacterianas pan-resistentes induzem o encistamento das AVL testadas, sendo elas de origem clínica ou ambiental. Podemos inferir a partir disto que as cepas de *A. baumannii* pan-resistentes isoladas de efluente hospitalar podem ter uma origem clínica e já ter tido contato com as AVL naquele ambiente. A interação entre AVL e bactérias proporciona vantagens para as AVL, mas o impacto sobre a sobrevivência das AVL está altamente ligada às características da cepa bacteriana com a qual ocorre a interação¹¹.

Também convém destacar que o raio de crescimento amebiano aumentou e não diminuiu em relação ao controle, feito com bactérias submetidas à morte por calor. Possivelmente este fenômeno ocorreu porque as espécies de *Acanthamoeba* são predadoras fagocíticas de bactérias presentes no ambiente, exercendo um papel chave no controle do tamanho das populações bacterianas. A habilidade de fagocitose das espécies de *Acanthamoeba* também está relacionada ao comportamento das bactérias como presa, como foi observado neste estudo e em outros estudos previamente realizados¹⁷.

O crescimento amebiano proporcionado pelo consumo de bactérias está diretamente relacionado à atividade fagocítica e digestão do material internalizado. Estudos mostram que há uma associação temporal entre o consumo bacteriano e o crescimento dos trofozoítos. Quando este é maior, sinaliza que as bactérias presentes no meio estão sendo mais avidamente fagocitadas, fato este que se reproduz no presente estudo, já que o número de trofozoítos no cultivo em meio líquido foi maior nos primeiros dias de análise, onde a concentração de bactérias no meio era maior, já que não foram feitas reposições ao longo do procedimento¹⁶. Também acredita-se que as células vivas de *Acinetobacter baumannii* são de mais fácil digestão em relação as células bacterianas mortas por calor, já que o crescimento amebiano mostrou-se maior no primeiro caso¹⁸.

A interação entre os isolados bacterianos e amebianos não é somente favorável para a *Acanthamoeba*, uma vez que esta pode também agir como um vetor de armazenamento e proliferação de *Acinetobacter baumannii*, favorecendo o desenvolvimento de mecanismos de defesa contra o ambiente intracelular¹⁰. Além disso, conforme demonstrado neste estudo, o contato destes dois microorganismos num

mesmo ambiente pode levar *Acanthamoeba* ao encistamento, o que não é favorável em um ambiente como o hospitalar, por este microorganismo causar patologias graves em indivíduos debilitados, podendo levar a óbito. Entretanto, nosso estudo demonstrou que quando presentes no mesmo ambiente, o contato entre os dois microorganismos pode levar ao encistamento da *Acanthamoeba*. O encistamento dos trofozoítos que ocorreu ao longo do experimento pode ter sido ocasionado por uma deficiência de nutrientes no meio ou pela secreção de substâncias pelas bactérias. Este fato pode sugerir que conforme a proliferação bacteriana decresce, ocorre a diminuição da fonte de alimento para *Acanthamoeba*, levando-a ao encistamento. Esse processo ocorre na natureza, já que o encistamento é uma resposta natural da ameba à falta de condições adequadas para sobrevivência. No ambiente hospitalar, por haver considerável número de pessoas imunodeprimidas, a presença da ameba oferece um grande risco à saúde dos pacientes, pois seus cistos resistem a diversos processos químicos de esterilização. Além disso, a sobrevivência de bactérias patogênicas no interior da *Acanthamoeba* spp. é viável. Sendo assim, uma vez que um cisto entre em contato com um paciente e encontre um ambiente favorável, poderá ocorrer o desencistamento, permitindo a liberação e proliferação de bactérias internalizadas, levando à sepse⁸.

1.6. CONCLUSÕES

A partir deste estudo, pode-se concluir que a interação entre isolados clínicos e de efluente hospitalar de *Acinetobacter baumannii* com diferentes perfis de susceptibilidade a antimicrobianos com cepas de *Acanthamoeba* spp. favorece estas últimas, quando ambos microorganismos são de mesma origem, induzindo uma menor formação de cistos amebianos e também aumentando o seu crescimento. Também

observou-se que a presença de mecanismos de aderência a células eucarióticas facilita o processo de fagocitose amebiana, porém mais estudos são necessários para elucidar como este processo ocorre.

1.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Karlowsky J, Draghi DC, Jones ME, Thornsberry C, Friedland IR, Sahn DF. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998-2001. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47:1681-1688.
2. Ferreira AE, Cunha GR, Fuentefria DB, Corção G. Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos em cepas de *Acinetobacter* spp isoladas de efluente hospitalar em Porto Alegre-RS. *Caderno de Farmácia.* 2007; 23:9-14.
3. Gales AC. et al. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2003; 45:77-79.
4. Sader HS. et al. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2005. 25:57-61.
5. Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* infection. *N Engl J Med* 2008; 358:1271-81.
6. Lee JC, Koerten H, Van der Broek P, Beekhuizen H, Wolterbeek R, Van der Barselaar M, et al. Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. *Res Microbiol.* 2006; 157:360-366.
7. Braun G, Vidotto MC. Evaluation of adherence, hemagglutination, and presence of genes coding for virulence factors of *Acinetobacter baumannii* causing urinary tract infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99(8):839-844.
8. Khan N A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev.* 2006; 30(4):564-595.

9. Marciano-Cabral F; Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. Clin Microbiol Rev. 2003; 16 (2):273–307.
10. Jeong HJ, Jang ES, Han BI, Lee KH, Ock MS, Kong HH, et al. *Acanthamoeba*: Could be an environmental host of *Shigella*? Exp Parasitol. 2007; 115:181-186.
11. Cengiz AM, Harmis N, Stapleton F. Co-incubations of *Acanthamoeba castellanii* with strains of *Pseudomonas aeruginosa* alters the survival of amoeba. Clin Experiment Ophthalmol. 2000; 28:191-193.
12. Fenner L, Richet H, Raoult D, Papazian L, Martin C, La Escola B. Are clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* more virulent than hospital environmental isolates in amebas co-culture test? Crit Care Med. 2006; 34(3):823-828.
13. Silva MEZ, Filho IC, Endo EH, Nakamura CV, Ueda-Nakamura T, Filho BPD. Characterisation of potential virulence markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated of drinking water. Antonie van Leeuwenhoek. 2008; 93:323–334.
14. De Carli GA, Parasitologia Clínica. 2ª Ed. Editora Atheneu. São Paulo. 2007.
15. García A, Solar H, González C, Zemelman R. Effect of EDTA on the resistance of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to the bactericidal activity of normal human serum. J Med Microbiol. 2000; 49:1047-1050.
16. Gohl O, F-riedrich A, Hoppert M, Averhoff B. The thin pili of *Acinetobacter* spp. strain BD413 mediate adhesion to biotic and abiotic surfaces. Appl. Environ. Microbiol. 2006; 72(2):1394-1401.
17. Moraes J, Alfieri SC. Growth, encystment and survival of *Acanthamoeba castellanii* grazing on different bacteria. FEMS Microbiol Ecol. 2008; 66:221-229.

18. Pickup ZL, Pickup R, Parry JD. Growth of *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis* on live, heat-killed and DTAF-stained bacterial prey. FEMS Microbiol Ecol. 2007; 61:264-272.

1.8. ANEXOS

1.8.1. Tabela 1: Resultado do teste de aderência às células epiteliais bucais dos isolados de *A. baumannii*.

Isolados	% de Aderência (n=100)		
	Fraca	Média	Forte
Controle	61	12	27
EF 1	84	9	7
EF 2	93	7	0
EF 3	81	13	6
EF 4	70	13	17
EF 5	58	18	24
EF 6	80	16	4
EF 7	76	12	12
IC 1	21	36	43
IC 2	22	36	42
IC 3	77	10	13
IC 4	54	15	31
IC 5	48	28	24
IC 6	76	9	15
IC 7	73	10	17

Legenda: EF – isolados bacterianos de efluente hospitalar; IC – isolados bacterianos clínicos; Cepas sensíveis: 1 e 2; MDR: 3,4 e 5; PR: 6 e 7.

1.8.4. Normas para publicação:

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical – Instruções aos autores

Formatação de Artigo Original

O manuscrito deve ser preparado usando *software* padrão de processamento de textos e deve ser impresso (fonte *times new Roman* tamanho 12) com espaço duplo em todo o texto, legendas para as figuras e referências, margens com pelos menos 3cm. O limite de palavras é de 6.000 com até 5 inserções (figuras e tabelas). O manuscrito deve ser dividido nas seguintes seções: Carta de envio, endereçada ao editor chefe, resumo estruturado, palavras-chaves, introdução, métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos e referências. Abreviações devem ser usadas com moderação.

Página de Título: deve incluir o nome dos autores na ordem direta e sem abreviações, graduações mais elevadas possuídas, afiliações em instituições com endereço acadêmico do autor correspondente e todos os co-autores e apoio financeiro.

Título: deve ser conciso, claro e o mais informativo possível, não deve conter abreviações e não deve exceder a 200 caracteres, incluindo espaços.

Título Corrente: com no máximo 70 caracteres.

Resumo Estruturado: deve condensar os resultados obtidos e as principais conclusões de tal forma que um leitor, não familiarizado com o assunto tratado no texto, consiga entender as implicações do artigo. O resumo não deve exceder 250 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves) e abreviações devem ser evitadas. Deve ser subdividido em: Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões.

Palavras-chaves: 3 a 6 itens devem ser listados imediatamente abaixo do resumo estruturado.

Introdução: deve ser curta e destacar os propósitos para o qual o estudo foi realizado. Apenas quando necessário citar estudos anteriores de relevância.

Métodos: devem ser suficientemente detalhados para que os leitores e revisores possam compreender precisamente o que foi feito e permitir que seja repetido por outros. Técnicas-padrões precisam apenas ser citadas.

Ética: em caso de experimentos em seres humanos, indicar se os procedimentos realizados estão em acordo com os padrões éticos do comitê de experimentação humana responsável (institucional, regional ou nacional) e com a Declaração de Helsinki de 1964, revisada em 1975, 1983, 1989, 1996 e 2000. Quando do relato de experimentos em animais, indicar se seguiu um guia do conselho nacional de pesquisa, ou qualquer lei sobre o cuidado e uso de animais em laboratório foram seguidas.

Resultados: devem ser um relato conciso e impessoal da nova informação. Evitar repetir no texto os dados apresentados em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve relacionar-se diretamente com o estudo que está sendo relatado. Não incluir uma revisão geral sobre o assunto, evitando que se torne excessivamente longa.

Agradecimentos: devem ser curtos, concisos e restritos aqueles realmente necessários, e, no caso de órgãos de fomento não usar siglas.

Conflito de Interesse: todos os autores devem revelar qualquer tipo de conflito de interesse existente durante o desenvolvimento do estudo.

Referências: devem ser numeradas consecutivamente, na medida em que aparecem no texto. Listar todos os autores quando houver até seis. Para sete ou mais, listar os seis primeiros, seguido por "et al". Digitar a lista de referências com espaçamento duplo em folha separada. Referências de comunicações pessoais, dados não publicados ou manuscritos "em preparação" ou "submetidos para publicação" não devem constar da

lista de referência. Se essenciais, podem ser incorporados em local apropriado no texto, entre parênteses da seguinte forma: (AB Figueiredo: Comunicação Pessoal, 1980); (CD Dias, EF Oliveira: dados não publicados). Citações no texto devem ser feitas pelo respectivo número das referências, acima da palavra correspondente, separado por vírgula (Ex.: Mundo.^{1,2,3}; Vida.^{30,42,44-50}). As referências no fim do manuscrito devem estar de acordo com o sistema de requisitos uniformes utilizado para manuscritos enviados para periódicos biomédicos (Consulte: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>). Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no "Index Medicus" (Consulte: <http://ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals&TabCmd=limits>).

Alguns exemplos de referências:

1. Russell FD, Coppel AL, Davenport AP. *In vitro* enzymatic processing of radiolabelled big ET-1 in human kidney as a food ingredient. *Biochem Pharmacol* 1998;55:697-701.
2. Porter RJ, Meldrum BS. Antiepileptic drugs. *In*: Katzung BG, editor. *Basic and clinical pharmacology*. 6th ed. Norwalk (CN): Appleton and Lange; 1995. p. 361-80.
3. Blenkinsopp A, Paxton P. *Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Figuras: devem preferencialmente ser submetidas em alta resolução no formato **TIFF**.

As figuras devem ser colocadas em arquivos separados, nomeados apenas com o número das figuras (ex.: Figura 1; Figura 2). Certifique-se que as mesmas têm uma resolução mínima de 300dpi.

Fotografias: devem ser enviadas com boa resolução (mínimo de 300dpi) no formato *TIFF*, preferencialmente, preparadas utilizando o *Adobe Photoshop*.

Gráficos: criados usando *Microsoft Word* ou *Excel*, devem ser salvos com a extensão original (**.doc** ou **.xls**). **Eles não devem ser copiados ou colados** de um programa para o outro.

Mapas e Ilustrações: devem ser vetorizadas (desenhados) profissionalmente utilizando os *softwares CorelDraw* ou *Illustrator* em alta resolução, e suas dimensões não devem ter mais que 21,5 x 28,0cm.

Imagens: produzidas em *software* estatístico devem ser convertidas para o formato *Excel* ou *PowerPoint*. Caso não seja possível, converter o arquivo para o formato *TIFF* com resolução de 300dpi, e enviar juntamente com o arquivo no formato original.

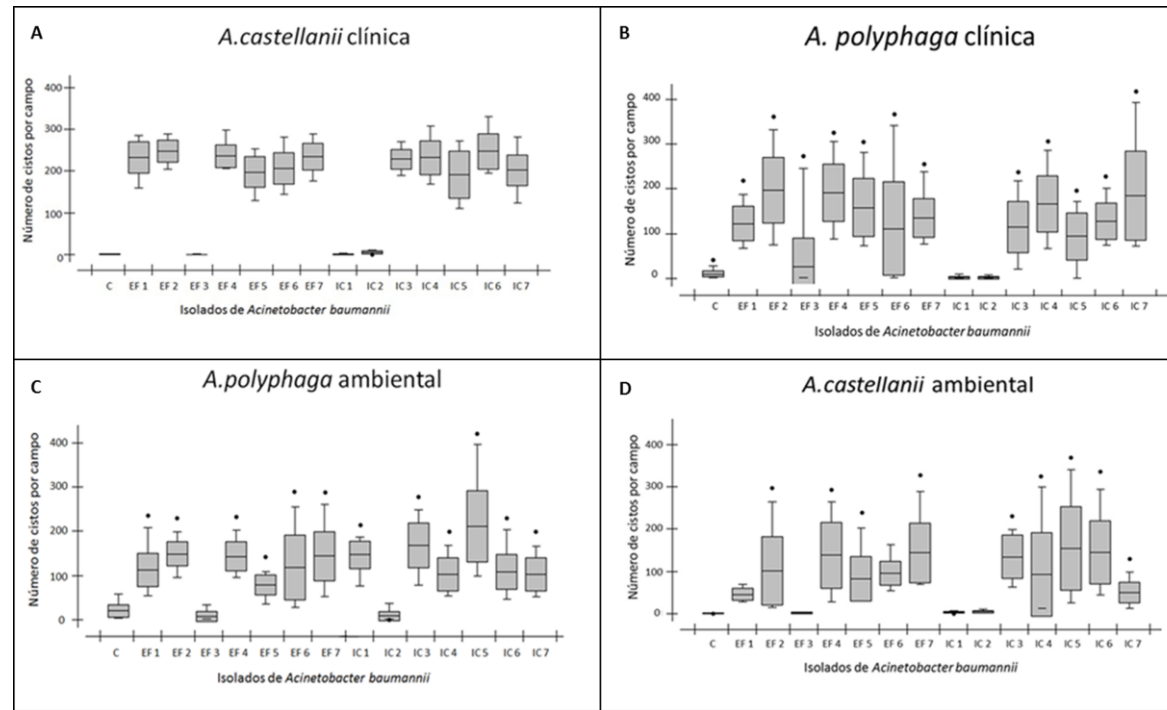
Legendas: nas figuras, as legendas devem ser digitadas juntas com espaçamento duplo em uma folha separada.

Ilustrações Coloridas: devem ser aprovadas pelos editores e as despesas extras para confecção de fotolitos coloridos serão de responsabilidade dos autores.

Tabelas: devem ser digitadas com espaçamento duplo, com um título curto e descritivo e submetido *online* em um arquivo separado. Legendas para cada tabela devem aparecer no rodapé da mesma página que a tabela. Todas as tabelas devem ter numeração arábica, citadas no texto, consecutivamente. Tabelas não devem ter linhas verticais, e linhas horizontais devem ser limitadas ao mínimo, com notas de rodapé logo abaixo. Tabelas devem ter no máximo 17cm de largura.

ANEXO 2

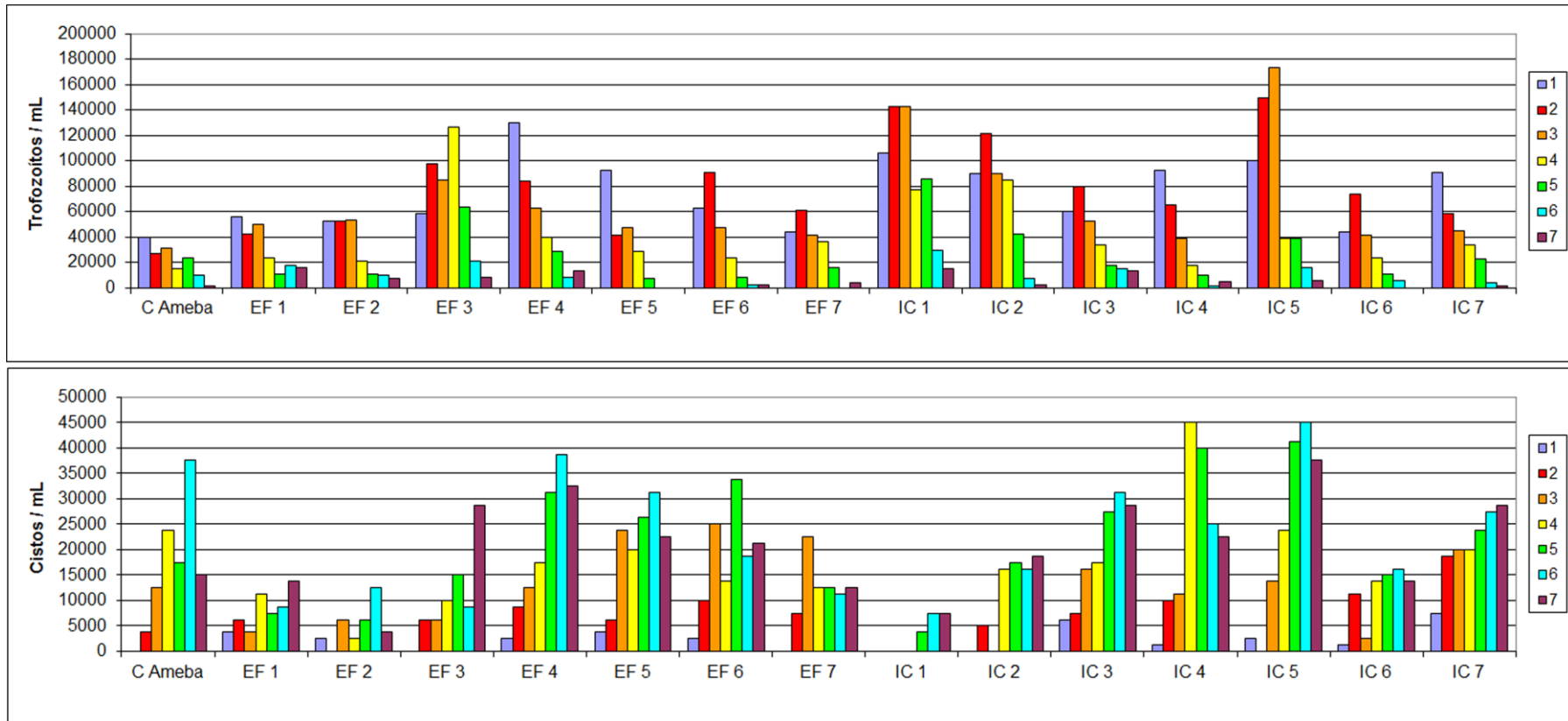
Figura 1: Resultados do teste de encistamento em meio sólido de espécies *Acanthamoeba* de diferentes origens ocasionada por co-cultivo com *Acinetobacter baumannii*.



Legenda: C – cepa controle; EF – isolados bacterianos de efluente hospitalar; IC – isolados bacterianos clínicos; Cepas sensíveis: 1 e 2; MDR: 3,4 e 5; PR: 6 e 7. Os isolados que apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle estão sinalizados (*).

ANEXO 3

Figura 2: Resultado do teste de co-cultivo em meio líquido de *Acanthamoeba castellanii* e *Acinetobacter baumannii*.



Legenda: C Ameba – cepa controle; EF – isolados bacterianos de efluente hospitalar; IC – isolados bacterianos clínicos; Cepas sensíveis: 1 e 2; MDR: 3,4 e 5; PR: 6 e 7. As diferentes cores sinalizam o dia que foi realizada a contagem (1 a 7 dias).