

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *ACANTHAMOEBA* spp.
EM ÁGUA DE TORNEIRA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO
SUL.**

Mari Aline Todero Winck

Dissertação de Mestrado

PORTO ALEGRE

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *ACANTHAMOEBA* spp.
EM ÁGUA DE TORNEIRA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO
SUL.**

MARI ALINE TODERO WINCK

Bióloga

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente na
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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

Porto Alegre (RS), Brasil

Abril, 2011

CIP - Catalogação na Publicação

Winck, Mari Aline Todero
Isolamento e caracterização de Acanthamoeba spp.
em água de torneira no estado do Rio Grande do Sul /
Mari Aline Todero Winck. -- 2011.
55 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, 2011.

1. Acanthamoeba. 2. Amebas de Vida Livre. 3. Água
de Torneira. I. Rott, Marilise Brittes, orient. II.
Título.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a minha orientadora, Professora Marilise B. Rott, que desde o primeiro dia me recebeu com muita atenção e carinho, obrigada pelo apoio e estímulo.

Aos meus colegas do Laboratório de Parasitologia, que se tornaram grandes amigos: Ana Maris, Caroline, Cecília, Cris, Dayane, Éder, Ismael, Karin, Lua, Roberta e Sílvia, com certeza vou levar para minha vida um pouquinho de cada um de vocês.

Ao meu noivo, namorado e amigo Antônio: te amo muito.

A minha família amada, meu pai Viliam, minha mãe Mari e minhas duas irmãs: Letícia e Mariana, amo vocês e obrigada pela compreensão. A todos os professores do Laboratório de Parasitologia: Prof. Carlos, Prof. Kanan, Prof^a. Márcia, Prof^a. Neusa e Prof^a. Onilda aprendi muito com cada um de vocês, com seus exemplos de vida e com suas atitudes.

Agradeço ao CECANE pela ajuda na coleta das amostras.

A todos meus colegas e professores do PPGMAA-UFRGS que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

E à Capes pelo apoio financeiro.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *ACANTHAMOEBA* EM ÁGUA DE TORNEIRA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL¹.

Autor: Mari Aline Todero Winck

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

RESUMO

Amebas de vida livre (AVL) do gênero *Acanthamoeba* estão amplamente distribuídas no ambiente e podem tornar-se amebas patogênicas ao homem. O objetivo deste trabalho foi isolar em de água de torneira amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba*, identificá-las e classificá-las. Um total de 132 amostras de água de torneira foi coletado de escolas estaduais e municipais entre os meses de março a novembro de 2009. As amostras passaram pelo processo de filtração e as membranas foram semeadas em ágar não-nutriente 1,5% coberto por uma suspensão de *E. coli* inativadas pelo calor. Todas as amostras positivas para AVL foram submetidas à clonagem celular e identificadas como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*, através da morfologia dos cistos e trofozoitos e pela PCR utilizando oligonucleotídeos gênero-específicos que amplificam a região ASA.S1 do gene 18S rDNA. Ensaio fisiológicos de termo e osmotolerância foram utilizados para avaliar a patogenicidade dos isolados. Vinte sete isolados foram positivos para AVL e 10 foram identificados como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* tanto pelas características morfológicas quanto pela análise molecular. Destes, nove isolados apresentaram características do grupo II e um do grupo III, segundo Pussard e Pons (1977). A análise do sequenciamento através da comparação das sequências dispostas no GenBank, demonstrou a distribuição no grupo genotípicos T2 (40%), T2/T6 (40%), T6 (10%) e T4 (10%). Nos ensaios de termotolerância e osmotolerância 50% dos isolados obtiveram um baixo potencial patogênico. Os resultados indicaram a presença do gênero *Acanthamoeba* em água tratada no estado do RS, revelando sua importância epidemiológica e a necessidade de mais estudos para determinar sua distribuição no ambiente e seu potencial patogênico.

Palavras-chave: Amebas de vida livre, *Acanthamoeba*, água de torneira, classificação genotípica, patogenicidade.

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 (55 p.). Abril, 2011.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *ACANTHAMOEBA* spp. IN TAP WATER IN THE STATE OF RIO GRANDE DO SUL¹.

Author: Mari Aline Todero Winck

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

ABSTRACT

Free-living amoebae (FLA) of *Acanthamoeba* genus are widely distributed in the environment and can become human pathogenic amoebae. The aim of this study was to isolate from tap water in free-living amoebae of *Acanthamoeba*, identify them and then classify them. A total of 132 samples of tap water was collected from state and municipal schools between march and november 2009. The samples passed through the filtration process and the membranes were seeded in non-nutrient 1.5% covered by a suspension of *E. coli* heat-inactivated. All samples of AVL were cloned and identified as belonging to the genus *Acanthamoeba* by the morphology of cysts and trophozoites by PCR using primers and genus-specific primers that amplify the ASA.S1 region of 18S rDNA gene. Tests of physiological thermotolerance and osmotolerance were used to evaluate the pathogenicity of the isolates. Twenty seven isolates of AVL and 10 were identified as belonging to the genus *Acanthamoeba* through the morphological and molecular analysis. Nine of the isolates showed characteristics of group II and one isolate showed characteristics of group III, according Pussard and Pons (1977). The sequencing analysis by comparing the sequences submitted to GenBank, showed that genotype distribution in group T2 (40%), T2/T6 (40%), T6 (10%) and T4 (10%). In tests of thermotolerance and osmotolerance 50% of isolates had a low pathogenic potential. The results indicated the presence of *Acanthamoeba* in tap water in the RS, revealing its importance and the need for more epidemiological studies to determine their distribution in the environment and its pathogenic potential.

Keywords: Free-living amoebae, *Acanthamoeba*, tap water, genotypic classification, pathogenicity.

¹Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (55 p.). Abril, 2011.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 O gênero <i>Acanthamoeba</i>	3
2.2 Distribuição ambiental	4
2.3 Aspectos morfológicos e ciclo de vida	5
2.4 Infecções causadas por <i>Acanthamoeba</i>	6
2.4.1 Encefalite amebiana granulomatosa (EAG)	7
2.4.2 Ceratite por <i>Acanthamoeba</i>	9
2.5 <i>Acanthamoeba</i> e bactérias endossimbiontes	11
2.6 Classificação morfológica e genotípica de <i>Acanthamoeba</i>	13
2.7 Potencial patogênico de <i>Acanthamoeba</i>	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Local de coleta	17
3.2 Isolados de referência da ATCC (“American Type Culture Collection”)	17
3.3 Coleta de água e isolamento de Amebas de Vida Livre (AVL)	17
3.4 Obtenção de culturas monoxênicas	18
3.5 Clonagem dos isolados monoxênicos	19
3.6 Identificação morfológica dos isolados do gênero <i>Acanthamoeba</i>	19
3.6.1 Coloração de cistos e trofozoitos	19
3.6.2 Análise morfológica e polietileno	20
3.6.3 Tempo de contração dos vacúolos pulsáteis	20
3.7 Identificação molecular dos isolados de <i>Acanthamoeba</i>	21
3.7.1 Extração de DNA total de <i>Acanthamoeba</i>	21
3.7.2 Quantificação do DNA de <i>Acanthamoeba</i>	22

3.7.3 Reação em cadeia de polimerase - PCR	22
3.7.4 Purificação do produto de PCR	23
3.7.5 Sequenciamento e análise dos fragmentos	23
3.8 Avaliação do potencial patogênico de isolados de <i>Acanthamoeba</i> através de testes de tolerância	23
3.8.1 Teste de Osmotolerância	24
3.8.2 Teste de Termotolerância	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
4.1 Isolamento de AVL em água da torneira	26
4.2 Clonagem dos isolados	27
4.3 Identificação morfológica dos isolados de AVL	28
4.4 Confirmação genotípica (PCR)	31
4.5 Análise do sequenciamento	32
4.6 Análise do potencial de patogenicidade dos isolados de <i>Acanthamoeba</i>	37
5 CONCLUSÕES	40
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
7 ANEXOS	52

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1. Dados epidemiológicos de <i>Acanthamoeba</i> spp _____	7
TABELA 2. Caracterização morfológica de isolados de AVL de água de torneira no Rio Grande do Sul – Brasil _____	29
TABELA 3. Comparação da região gênica dos isolados desse estudo com espécies do gênero <i>Acanthamoeba</i> publicadas no GenBank _____	33
TABELA 4. Análise da similaridade entre as sequências parciais do gene 18S rDNA de <i>Acanthamoeba</i> dos isolados de água de torneira deste estudo e das registradas no GenBank _____	36
TABELA 5. Diferenciação da patogenicidade de isolados de <i>Acanthamoeba</i> por testes de tolerância _____	38

RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA 1. Ceratite por <i>Acanthamoeba</i> _____	9
FIGURA 2. Trofozoítos de <i>A. astronyxis</i> carreando <i>L. pneumophila</i> em vesículas citoplasmáticas em co-cultura <i>in vitro</i> _____	12
FIGURA 3. Cultura de AVL em placa contaminada _____	27
FIGURA 4. Crescimento de AVL em ANN com <i>E. coli</i> _____	28
FIGURA 5. Características do gênero <i>Acanthamoeba</i> _____	30
FIGURA 6. Cistos do grupo II _____	30
FIGURA 7. Cistos do grupo III _____	30
FIGURA 8. Produtos de amplificação da PCR do fragmento ASA.S1 do gene 18S rDNA _____	31

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Percentual
°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
µm	Micrômetro
µL	Microlitro
µg	Micrograma
ASA.S1	<i>Acanthamoeba specific amplimer S1</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AVL	Amebas de Vida Livre
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CECANE	Centro Colaborador em Alimentação e Nutrição do Escolar Sul
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EAG	Encefalite Amebiana Granulomatosa
EUA	Estados Unidos da América
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
et al.	et allii (e colaboradores)

h	hora
HCl	Ácido clorídrico
K	Potássio
KCl	Cloreto de potássio
m³	Metro cúbico
min	Minuto
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
M	Molar
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
Nº	Número
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
pb	Pares de base
PBS	Tampão de sal fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
qsq	Quantidade suficiente para
rDNA	DNA ribossomal
RS	Rio Grande do Sul
spp.	Espécies
U	Unidade
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

1 INTRODUÇÃO

As amebas de vida livre (AVL) estão amplamente distribuídas no ambiente e já foram isoladas no ar, no solo e na água (Martinez & Visvesvara, 1997). Embora não precisem de um hospedeiro para sobreviver, por algum motivo algumas se tornam parasitas oportunistas, como é o caso de representantes do gênero *Acanthamoeba*. (Visvesvara et al., 2007).

Entre as amebas de vida livre, *Acanthamoeba* é o gênero mais comum na natureza, podendo resistir a condições elevadas de temperatura, pH e também à desinfecção pelo cloro (Cursons et al., 1980). Nos últimos anos, o interesse de pesquisadores em analisar o gênero *Acanthamoeba* vem aumentando. Sua evidência está relacionada aos casos de encefalite amebiana granulomatosa e principalmente à ceratite acantamebiana. A infecção ocular, que acomete principalmente usuários de lentes de contacto, por facilitar a ocorrência de pequenas escoriações na córnea, demonstra importante relação da água contaminada por *Acanthamoeba* com essa patologia (Martinez & Visvesvara, 1997). Já, a encefalite amebiana granulomatosa, provavelmente

está associada à contaminação através do trato respiratório ou ulcerações da pele atingindo o SNC por via hematogênica (Martinez & Visvesvara, 1997).

O conhecimento sobre a distribuição deste protozoário e principalmente sua classificação genotípica é importante para produção de novos dados epidemiológicos, uma vez que ainda não temos uma classificação consistente e nem dados concretos sobre os fatores que levam alguns isolados a serem mais patogênicos que outros. Assim, este trabalho busca pela primeira vez isolar e caracterizar isolados do gênero *Acanthamoeba* em água de torneira no estado do RS.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Gênero *Acanthamoeba*

Os protozoários que compõem este gênero estão amplamente distribuídos na natureza e são as amebas de vida livre (AVL) mais isoladas no ambiente (Page, 1967). Segundo Visvesvara e colaboradores (2007) o gênero *Acanthamoeba* é representado por aproximadamente 24 espécies de acordo com suas características morfológicas e algumas são consideradas potencialmente patogênicas (Shuster & Visvesvara, 2004).

O primeiro relato sobre sua importância médica ocorreu em 1958, quando Culbertson e colaboradores analisaram as causas da morte de animais de laboratório, após serem inoculados com uma vacina contra poliomielite pela via intranasal. Os pesquisadores descobriram que esta vacina estava contaminada por AVL pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*.

A encefalite causada por este protozoário é denominada Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) e está associada a pacientes imunocomprometidos (Martinez & Visvesvara, 1997). No caso da ceratite causada por *Acanthamoeba* spp. os primeiros relatos de diagnóstico foram feitos na Grã Bretanha (1974) por Nagington et al. e nos Estados Unidos (1975)

por Jones et al. Esta patologia atinge, ao contrário da EAG, pessoas imunocompetentes (Nieder Korn et al., 1999).

Atualmente o gênero *Acanthamoeba* é considerado um patógeno oportunista e emergente, apresentando um caráter anfitrião e podendo causar doenças tanto em humanos como em animais (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Visvesvara et al., 2007; Walochnik et al., 1999).

2.2 Distribuição ambiental

Espécies de *Acanthamoeba* já foram isoladas em muitos ambientes como o solo (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Booton et al., 2004; Lorenzo-Morales et al., 2005a), água doce de lagos e rios (Ettinger et al., 2003; Lorenzo-Morales et al., 2005b; Lorenzo-Morales et al., 2006), piscinas (Tsvetkova et al., 2004; Górnik & Kuznagrygiel-Grygiel, 2004; Gianinazzi et al., 2009, Caumo et al., 2009), em águas aquecidas de sistema hospitalar (Rohr et al., 1998), correntes subterrâneas, água mineral engarrafada e em água marinha (Lorenzo-Morales et al., 2005c), em água de torneira (Jeong et al., 2007; Boost et al., 2008; Magliano et al., 2009; Edagawa et al., 2009; Bonilla-Lemus et al., 2010; Stockman et al., 2011), estação lava-olhos de emergência em laboratórios (Paszko-Kolva et al., 1991); unidades de tratamento dental (Barbeau & Buhler, 2001) e unidades hospitalares (Carlesso et al., 2010), além de soluções de limpeza contidas em estojos de lentes de contato (Martinez & Visvesvara, 1997; Radford et al., 1998; Sharma et al., 2000; Parija et al., 2001; Pens et al., 2008). Podem ainda ser encontradas no ar (Kingston & Warhurst, 1969), nos sistemas umidificados, em materiais cirúrgicos, em cultivos celulares e mesmo em aparelhos de ar condicionado (Foronda, 1996). No ser

humano podem ser encontradas no nariz, na traquéia de pacientes com vias respiratórias afetadas, nas secreções bronquiais, no ouvido e no sistema nervoso central (Byrne & Burd, 1995; Kodet et al., 1998).

Sua ampla distribuição garante ao gênero uma maior importância ecológica (Schuster & Visvesvara, 2004), pois estão em constante contato com animais e humanos. Segundo um estudo realizado por Chappell (2001) mais de 80% da população assintomática possui anticorpos contra espécies do gênero *Acanthamoeba*.

2.3 Aspectos morfológicos e ciclo de vida

As amebas do gênero *Acanthamoeba* possuem duas formas: o trofozoíto e o cisto. O trofozoíto, que é a forma vegetativa da célula é o estágio em que ela se locomove, se alimenta de bactérias, algas, fungos, leveduras, matéria orgânica ou inclusão de partículas líquidas e também se reproduz através de divisão binária. Quando passa para a forma de cisto, a ameba está se protegendo de ambientes adversos como a falta de alimentos e a presença de agentes químicos (PAGE, 1988).

Os trofozoítos são células com tamanhos de 14 a 40 μm de diâmetro, variando significativamente entre isolados pertencentes a diferentes espécies/genótipos (Visvesvara & Schuster, 2008). Seu citoplasma é abundante e apresenta-se granuloso com movimentos polidirecionais. Através da emissão de pseudópodes globosos e hialinos surgem finos pseudópodes semelhantes a espinhos, chamados de acantopódios, que são estruturas características de representantes do gênero. Estas, apresentando-se como projeções aciculiformes da membrana celular e são importantes na adesão a

superfícies (biológica ou inerte), movimentos celulares, além da captura de organismos (Khan, 2006). Geralmente os trofozoítos são uninucleados com um grande nucléolo central (Marciano-Cabral & Cabral, 2003). O citoplasma apresenta diversos vacúolos e possui um vacúolo contrátil proeminente, que desaparece temporariamente e reaparece em um movimento de sístole-diástole, responsável pelo controle osmótico da célula, bem como vacúolos digestivos (Page, 1967).

Os cistos podem medir de 10 a 20 μm e possuem parede dupla: o endocisto que é a membrana interna e o ectocisto que é a parede externa. De forma geral, o ectocisto é mais esférico, enquanto o endocisto apresenta diversas formas, que dependendo do isolado, podem variar de triangulares a estreladas. Os cistos apresentam um opérculo, local por onde a ameba sai ao desencistar assim que as condições ambientais se tornam favoráveis. Os dois envoltórios são separados entre si, mas se unem nos ostíolos, que são poros usados para monitorar as alterações ambientais. A distância entre as paredes do cisto e o número de pontos em que o endocisto se comunica com o ectocisto (braços do endocisto) também são variáveis (Page, 1988; Giazzi, 1996; Schuster & Visvesvara, 2004).

2.4 Infecções causadas por *Acanthamoeba* spp.

Em 1957, Jahnes e colaboradores observaram a destruição de células de mamífero por uma cepa de *Acanthamoeba* sp., que havia contaminado uma cultura de células de rim de macaco e até então, sabia-se que espécies deste gênero eram inofensivas aos seres humanos. A partir daí, muitas investigações se sucederam e atualmente é bem conhecido que as patologias que

Acanthamoeba pode causar estão relacionadas com a via de transmissão, estado imunológico do paciente (Armstrong, 2000), fatores de virulência como a habilidade da ameba de se ligar as células hospedeiras, além da produção de enzimas hidrolíticas: as proteases (Odom, et al., 1997; Khan, 2000, 2006).

Espécies de *Acanthamoeba* são responsabilizadas principalmente por dois tipos de patologia em humanos: ceratite por *Acanthamoeba* e encefalite amebiana granulomatosa (EAG) (Tabela 1). As infecções sistêmicas e as que afetam o sistema nervoso central atingem pacientes que apresentam uma imunodepressão geral, enquanto as infecções corneanas são favorecidas por uma imunossupressão local (Armstrong, 2000).

Tabela 1 - Dados epidemiológicos de *Acanthamoeba* spp

Doença	Estimativa de casos em humanos (período da análise)
Encefalite Amebiana Granulomatosa	~200 casos (1960 a ~2000)
Ceratite por <i>Acanthamoeba</i>	>3000 casos (1980 a ~2000)

Adaptado de Schuster et al., 2004.

2.4.1 Encefalite amebiana granulomatosa (EAG)

É uma doença considerada oportunista, pois quase todos os casos são diagnosticados em indivíduos imunologicamente debilitados, especialmente aqueles que sofrem algum tipo de terapia ou situação imunossupressora (Ferrante, 1991; Visvesvara, 1991; Turner et al., 2000). Porém já existem relatos desta infecção em crianças e adultos

imunocompetentes (Sangruchi et al, 1994; Singhal et al, 2001; Lackner et al, 2010). A patologia é caracterizada por um quadro infeccioso crônico, lento e progressivo do sistema nervoso central (Martinez & Visvesvara, 1997; Visvesvara et al, 2007). As espécies mais frequentes nos casos de EAG são: *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. rhysodes* e *A. divionensis* (Walochnik et al, 2000a; Silva & Rosa, 2003).

As manifestações clínicas mais comuns são deficiências neurológicas focais, sinais de aumento de pressão intracraniana, distúrbios mentais, alterações de comportamento, convulsões, hemiparesia, cefaléia e febre (Visvesvara, et al., 1990). A maioria dos relatos de EAG tiveram resultados fatais (Qvarnstrom et al., 2006).

A invasão pode ocorrer pela pele (ulcerações) ou pelo trato respiratório (neuroepitélio), seguindo então por via sanguínea até o sistema nervoso central (Martinez & Visvesvara, 1997). O diagnóstico em pacientes com sintomas neurológicos pode ser citopatológico, utilizando amostras de fluido cérebro espinhal (Sharma et al, 1993; Singhal et al, 2001). Os métodos de cultivo também são úteis no diagnóstico utilizando amostras biológicas em meio de crescimento para ameba (Martinez & Visvesvara, 1991).

A constatação de altos níveis de anticorpos *Acanthamoeba*-específicos pode ajudar na confirmação da suspeita da infecção. Além dessas análises, métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) estão sendo desenvolvidos para o diagnóstico de EAG por *Acanthamoeba*, a fim de aumentar a chance de cura (Khan, 2003; Schuster & Visvesvara, 2004).

2.4.2 Ceratite por *Acanthamoeba*

Quando o trofozoíto de *Acanthamoeba* entra em contato com a córnea ele adere e penetra no epitélio. Para isso ocorrer, acredita-se que haja a necessidade da existência de uma lesão prévia. A ceratite por *Acanthamoeba* é uma infecção invasiva da córnea, que se caracteriza pela perda gradual da visão, chegando, em alguns casos, a provocar cegueira (Radford et al., 1998). No início da patogenia as amebas ficam restritas ao epitélio da córnea, mas progridem e invadem o estroma, onde causam grande destruição e provocam inflamação. O fator clínico mais característico, conforme Figura 1, é a presença de um infiltrado inflamatório estromal em forma de anel, constituído principalmente por neutrófilos (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Visvesvara et al, 2007). O diagnóstico clínico pode ser feito baseado na constatação de lesões epiteliais, infiltrado estromal e ceratoneurite radial associados a sintomas como dor intensa e fotofobia (Marciano-Cabral & Cabral, 2003). O uso de agentes antimicrobianos, antivirais, antifúngicos ou corticóides pode mascarar o quadro clínico e contribuir para a progressão da doença (Ey et al, 2008).



Figura 1 – Ceratite por *Acanthamoeba*. Inflamação no estroma em forma de anel (Fonte: VISVESVARA et al, 2007).

Os sintomas mais comuns da ceratite por *Acanthamoeba* são fotofobia, opacidade da córnea, dores intensas (normalmente desproporcionais à gravidade aparente das lesões) e diminuição da visão (Illingworth & Cook, 1998, Visvesvara et al., 1990). Ao contrário da EAG a ceratite por *Acanthamoeba* pode ocorrer em indivíduos imunocompetentes (Niederhorn, et al., 1999).

Relatos de casos de ceratite por *Acanthamoeba* vêm aumentando significativamente nos últimos anos, paralelamente à popularização do uso de lentes de contato. Apesar disso, 10 a 15% dos casos ocorrem em pessoas que não usaram lentes de contato (Illinworth & Cook, 1998).

Assim, a maioria dos casos de ceratite por *Acanthamoeba* têm sido associados aos usuários de lentes de contato, estando relacionados também ao uso de soluções salinas caseiras para limpeza, ao uso da água de torneira e à falta de higiene na manutenção das lentes. A falta de cuidados higiênicos durante a limpeza e armazenamento das lentes e de seus estojos, produz um biofilme bacteriano, que pode servir de alimentação para amebas (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Visvesvara et al., 2007). Outro fator de risco é o uso de lentes de contato durante atividades recreativas em piscinas ou fontes naturais de água que possam albergar microbiota bacteriana e amebas patogênicas (Singhal et al., 2001).

O grupo genótipo T4 apresenta a maior dominância nos casos de ceratite por *Acanthamoeba* (Stothard et al., 1998). As espécies mais associadas a causarem ceratite amebiana são *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *A. culbertsoni*, *A. rhyodes*, *A. griffinii*, *A. quina* e *A. lugdunensis* (Schaumberg et al, 1998, Visvesvara et al, 2007). Aparentemente não há

diferença na manifestação clínica entre diversas espécies de *Acanthamoeba* quando causando ceratite. Apenas alguns isolados apresentam potencial patogênico e alguns marcadores podem ser utilizados para diferenciar isolados patogênicos de não patogênicos, tais como, a atividade proteolítica, termotolerância, osmotolerância e efeito citopático (Khan, 2006).

2.5 *Acanthamoeba* e bactérias endossimbiontes

Devido à ampla distribuição ambiental do gênero *Acanthamoeba* vários estudos tem sido realizados sobre este organismo e um aspecto bastante interessante, além das patologias já abordadas é a habilidade de se tornarem hospedeiros de bactérias patogênicas, tais como: *Legionella* spp., *Mycobacterium avium*, *Listeria monocytogenes*, *Burkholderia pseudomallei*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* sorotipo O 157, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori* e *Acanthamoeba* *felis* (Greub & Raoult, 2004). As amebas acabam tornando-se reservatórios ambientais de patógenos, comportando-se como o “cavalo de Tróia” do mundo microbiano (Barker & Brown, 1994). Aproximadamente 20 a 24% dos isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba* carregam bactérias e patógenos intracelulares obrigatórios como *Chlamydia* e *Legionella* (Greub & Raoult, 2004; Schmitz-Esser et al., 2008). Amebas presentes em fontes de água podem sobreviver a vários processos de purificação como o uso de biocidas e desinfetantes como cloro e ozônio (Rohr et al., 1998; Aksozek et al., 2002; Thomas et al., 2006) e quando infectadas por bactérias resistentes a amebas (BRA), assim denominadas por resistirem ao processo de digestão quando fagocitadas por elas, acabam por aumentar a resistência das bactérias, pois impedem que os produtos utilizados

para a desinfecção atinjam estes microrganismos, propiciando a dispersão e permanência de bactérias patogênicas no ambiente (Cirillo et al., 1994). A *Legionella* é um endossimbionte de *Acanthamoeba* e também parasito de macrófagos humanos. Sua habilidade de sobreviver na ameba pode ser uma fase pré-adaptativa para infectar células humanas (Figura 2) (Visvesvara & Schuster, 2008). A associação ameba-bactéria poderá provocar a perda da susceptibilidade a certos antibióticos, como ocorre no caso de *L. pneumophila* e *Micobacterium avium* quando infectam espécies de *Acanthamoeba*. O mecanismo pelo qual adquirem este tipo de resistência é desconhecido e não há evidências que estes fenótipos possam manter-se fora da ameba (Barker & Brown, 1994).

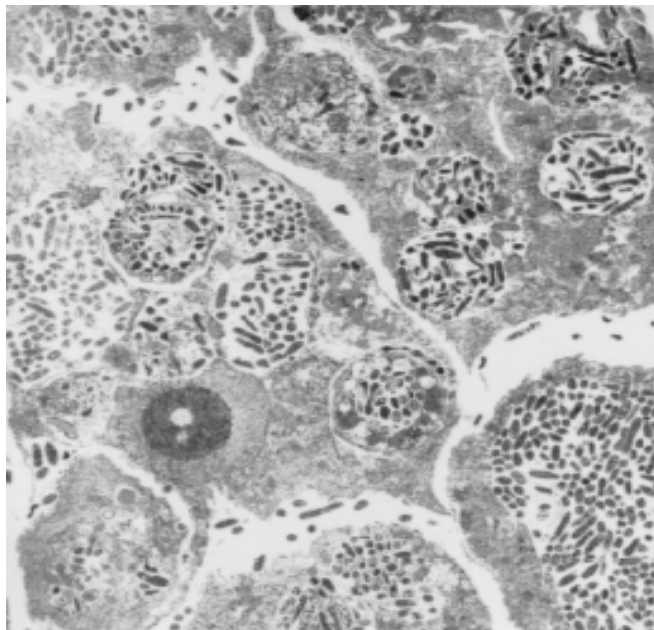


Figura 2 - Trofozoítos de *A. astronyxis* carregando *L. pneumophila* em vesículas citoplasmáticas em co-cultura *in vitro*. (Fonte: Visvesvara & Schuster, 2008).

2.6 Classificação morfológica e genotípica de *Acanthamoeba*

O gênero *Acanthamoeba* apresenta formas bem características dos seus trofozoítos e cistos, sendo possível sua identificação através da análise morfológica (Page, 1967; Bowers & Korn, 1968). Entretanto, a taxonomia em nível de espécie ainda é bastante indeterminada (Alves, 2006).

Em 1977, Pussard & Pons propuseram a divisão do gênero *Acanthamoeba* em três grupos morfológicos com 18 espécies, baseados no tamanho e na forma dos cistos.

No grupo I, as espécies são caracterizadas por apresentarem cistos grandes de 16 a 30 μm de diâmetro quando comparados aos do grupo II e III (Visvesvara & Schuster, 2008), os quais se caracterizam pela forma estrelada da parede cística interna (endocisto) e a parede externa (ectocisto) é mais ou menos esférica (Pussard & Pons, 1977).

No grupo II encontramos as espécies de *Acanthamoeba* mais distribuídas e isoladas no ambiente, seus cistos possuem um tamanho médio com diâmetro de 18 μm ou menos, o endocisto pode apresentar-se de forma estrelada, oval, triangular ou quadrangular e o ectocisto segue mais ou menos o contorno do endocisto (Khan, 2006).

O grupo III compreende as espécies cujos cistos medem aproximadamente 18 μm ou menos de diâmetro, com endocisto arredondado ou globoso, nunca estrelado. O ectocisto fino e liso ou fracamente franzido, justaposto ao endocisto é, às vezes, difícil de ser observado (Khan, 2006; Visvesvara & Schuster, 2008).

A caracterização através dos cistos é bastante utilizada nos estudos taxonômicos, mas estas características podem mudar conforme as condições

de cultivo, trazendo dúvida e discussão em torno da identificação morfológica (Visvesvara, 1991; Kilvington et al., 1991).

Novos métodos têm sido propostos para a identificação de AVL, utilizados tanto para auxiliar o diagnóstico como também para sua identificação em amostras ambientais (Kilvington & Beeching, 1995; Lehmann et al, 1998; Marciano-Cabral & Cabral, 2003). Os métodos aplicados até hoje para a tentativa de uma nova classificação foram: a análise do perfil de proteínas antigênicas através de técnicas de *Western Blot* ou imunofluorescência, a análise do perfil de isoenzimas por eletroforese (De Jonkheere, 1983; Costas & Griffiths, 1985), técnicas moleculares como RFLP (*Restriction Fragment length polymorphism*) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), que tiveram problemas devido ao alto polimorfismo entre isolados individuais (Kong et al, 1995; Kim et al, 1996; Alves et al, 2000).

O critério mais aceito hoje para a classificação de *Acanthamoeba* tem sido a utilização da sequência do 18S rDNA. Com base na variabilidade entre as sequências do gene completo 18S rDNA, Stothard e colaboradores (1998) classificaram 53 isolados de *Acanthamoeba* separando-os em 12 tipos sequenciais, de T1 a T12, depois mais quatro grupos foram identificados: T13 (Horn et al, 1999); T14 (Gast, 2001); T15 (Hewett et al, 2003) e T16 (Corsaro & Venditti, 2010), não sendo descartada a hipótese da existência de mais tipos sequenciais. Através do uso das sequências do gene 18S rDNA autores têm sugerido que cada tipo de sequência poderia ser considerado como uma espécie separada (Khan, 2006).

Desta forma, a análise do fragmento ASA.S1 (*Acanthamoeba Specific Amplimer S1*) do gene 18S rDNA (Schroeder et al, 2001) tem sido

utilizada nos estudos taxonômicos de *Acanthamoeba* e é considerada parâmetro de identificação genotípica em amostras clínicas e ambientais deste protozoário em todo o mundo (Walochnik et al, 2000; Schroeder et al, 2001; Visvesvara et al, 2010).

A correta classificação é importante para determinar aspectos sobre a ecologia, a patogenicidade e a epidemiologia deste gênero (Alves, 2001), por esse motivo ainda há discussões sobre a determinação de uma classificação ainda mais convincente (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Visvesvara et al, 2007).

2.7 Potencial patogênico de *Acanthamoeba*

Os motivos que levam algumas espécies de *Acanthamoeba* a desenvolverem um potencial patogênico ainda é pouco conhecido (Khan, 2001). Cada cepa pode desenvolver características distintas de patogenicidade (Mazur et al, 1995; Walochnik et al, 2000) tornando a classificação genotípica sem respostas quanto à patogenia de um isolado (Duarte, 2010).

Os estudos que buscam a identificação de isolados ambientais potencialmente patogênicos seriam de grande interesse em saúde pública, uma vez que já foi demonstrada sua ampla distribuição e resistência na natureza (Alves, 2001).

Alguns testes têm sido estabelecidos para determinar o potencial patogênico de *Acanthamoeba*. As análises de termotolerância são realizadas para avaliar a capacidade de crescimento destes organismos em diferentes temperaturas. A resistência de espécies à temperatura de 37°C demonstra a capacidade que a ameba teria em sobreviver à temperatura corporal humana.

Já as temperaturas superiores a 37°C, como o teste de crescimento a 42°C são utilizadas para determinar o potencial patogênico de *Acanthamoeba*, comparando essa temperatura à da febre humana (Walochnik et al, 2000a; Khan et al, 2001). A termotolerância é uma característica genotípica de algumas AVL, que pode se expressar em um hospedeiro, conferindo a elas a capacidade de permanecerem viáveis nos mesmos (Odom et al., 1997; Schuster & Visvesvara, 2004).

Para substituir os testes que utilizam células de cultura, Khan e colaboradores (2001) sugeriram ensaios de osmotolerância, na qual somente os isolados que tivessem a capacidade de sobreviver em alta osmolaridade, seriam considerados potencialmente patogênicos. Estes determinantes fisiológicos como a termo e a osmotolerância podem ser usados na diferenciação e prévia caracterização de isolados clínicos e ambientais correlacionados a testes de efeito citopático (Khan et al., 2001). O mecanismo de adaptação a altas temperaturas e osmolaridade mantendo sua atividade metabólica ainda é desconhecido em *Acanthamoeba* (Khan, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados de referência da ATCC (“American Type Culture Collection”)

Os isolados utilizados como controles neste trabalho foram: *Acanthamoeba castellanii* Neff (ATCC 30010), *Acanthamoeba castellanii* T4 (ATCC 50492), *Acanthamoeba polyphaga* isolado clínico (ATCC 30461), *Acanthamoeba polyphaga* isolado ambiental de água doce (ATCC 30782).

3.2 Local de Coleta

Amostras de água da torneira foram coletadas de 132 Escolas Estaduais e Municipais do Estado do Rio Grande do Sul. As cidades envolvidas foram: Porto Alegre, Santa Cruz do Sul, Caxias do Sul, Pelotas, Bagé, Passo Fundo e Santa Maria. As coletas foram realizadas entre os meses de março e novembro de 2009 com aprovação do responsável de cada unidade escolar.

3.3 Coleta de água e isolamento de Amebas de Vida Livre (AVL)

Amostras de 1000 mL de água foram coletadas após a higienização da superfície da torneira com etanol 70% e escoamento prévio da água por cerca de 2 minutos. Em seguida as amostras eram identificadas e transportadas ao laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), onde eram armazenadas sob refrigeração, para

processamento e análise no prazo máximo de 24h. Para a concentração das amebas de vida livre, as amostras foram filtradas através de uma membrana de nitrato de celulose com porosidade de 3,0 µm e diâmetro de 47 mm (Sartorius Biotech) com o auxílio de uma bomba de vácuo (Prismatec, 2.2 m³/h). Cada membrana, que representava uma amostra, foi invertida e semeada em uma placa contendo ágar não-nutriente (ANN) 1,5% (Anexo A) coberta com uma suspensão de *Escherichia coli* (ATCC 25922) inativadas pelo calor a 56°C/2 h. As placas foram incubadas a 30°C e observadas diariamente em microscópio óptico (aumento de 100X) durante um período máximo de 15 dias. Após este período as placas negativas foram descartadas e as positivas foram destinadas ao processo de monoxenização.

3.4 Obtenção de culturas monoxênicas

As amostras de água positivas para amebas de vida livre, isto é, em que havia presença de trofozoítos ou cistos nas placas, identificadas através da microscopia óptica, foram submetidas a sucessivos subcultivos, com a finalidade de manter os isolados e eliminar possíveis contaminantes ambientais, tais como fungos filamentosos, leveduras e bactérias para obtenção de um cultivo monoxênico. As áreas com crescimento de AVL foram marcadas com um círculo e posteriormente as placas foram abertas sob condições de esterilidade. Com auxílio de uma lâmina estéril, um pedaço de ágar com trofozoítos foi cortado, removido e semeado com a face voltada para baixo em uma nova placa de ANN coberta com *Escherichia coli* (ATCC 25922). As placas foram seladas e incubadas a uma temperatura de 30°C.

3.5 Clonagem dos isolados monoxênicos

A clonagem de cada amostra foi realizada através da técnica de diluições sucessivas. Primeiro as amostras contendo um crescimento exponencial de trofozoítos foram colocadas sobre o gelo por cerca de 10 min. Dentro de cada placa de cultivo foram adicionados 5 mL de solução salina de Page (Anexo A) e com uma alça de platina foram realizados movimentos suaves de raspagem. A suspensão foi transferida para um tubo e centrifugada a $250 \times g / 5 \text{ min}$. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi diluído em tampão fosfato pH 7,2 (PBS) para quantificação. Após contagem em câmara de Fuchs Rosenthal, a concentração foi ajustada em 200 trofozoítos/mL, estimando-se a presença de um trofozoíto a cada 5 μL . Placas de Petri contendo ANN foram demarcadas com retículo e 5 μL da suspensão foram gotejados com o objetivo de semear apenas um trofozoíto em cada quadrado. Após a visualização de apenas uma célula, o espaço demarcado contendo ágar foi retirado com uma lâmina estéril e cultivado em uma nova placa a fim de obter um clone.

3.6 Identificação morfológica dos isolados do gênero *Acanthamoeba*

3.6.1 Coloração de cistos e trofozoítos

Cistos e trofozoítos foram retirados das culturas em meio ANN seguindo o mesmo procedimento de raspagem utilizado na técnica de clonagem. A suspensão foi centrifugada a $250 \times g$ por 10 min. O sobrenadante foi retirado e o sedimento foi suspenso em 1 mL de tampão fosfato pH 7,2

(PBS). Este procedimento de lavagem foi realizado três vezes e após foi adicionado o fixador de Schaudinn (ANEXO A). Alíquotas de 100 µL desta suspensão foram espalhadas sobre lâminas de vidro limpas e desengorduradas. As lâminas foram secas em estufa bacteriológica a 37°C durante cerca de uma hora. Depois de fixadas, foram coradas pelo tricrômico conforme Garcia & Brückner, 1997 (ANEXO A).

3.6.2 Análise morfológica

As AVL isoladas de água da torneira foram avaliadas morfológicamente de acordo com os aspectos dos trofozoítos (Schuster & Visvesvara, 2004a). A análise dos cistos baseou-se na observação da sua dupla parede conforme os critérios descritos por Pussard & Pons (1977) e Page (1988).

O estudo morfométrico foi realizado em microscópio óptico, a partir de lâminas coradas com tricrômico, utilizando ocular micrométrica (aumento de 1000X). Foram medidos 10 trofozoítos e 10 cistos de cada isolado para obtenção de uma média aritmética e cálculo de desvio padrão.

3.6.3 Tempo de contração dos vacúolos pulsáteis

O tempo de contração dos vacúolos pulsáteis foi determinado a partir da observação dos trofozoítos em culturas monoxênicas em microscópio óptico (aumento de 100X). O tempo foi cronometrado, iniciando a contagem a partir do fechamento do vacúolo e terminado o tempo após a abertura total do mesmo e novo fechamento (De Carli, 2001). O tempo de contração dos vacúolos pulsáteis foi estimado a partir do tempo médio verificado em cinco trofozoítos de cada isolado.

3.7 Identificação molecular dos isolados de *Acanthamoeba*

3.7.1 Extração de DNA total de *Acanthamoeba*

DNA total dos isolados de *Acanthamoeba* foi obtido através do emprego do protocolo descrito por Salah & Iciar (1997) com algumas modificações. Uma suspensão proveniente dos cultivos monoxênicos dos isolados de *Acanthamoeba*, contendo 10^6 a 10^7 trofozoítos/mL foi centrifugada a $250 \times g$ durante 10 min. O sedimento foi submetido a três lavagens com 1 mL de PBS estéril e centrifugado por 3 min a $250 \times g$, para eliminar os restos de meio de cultivo. Posteriormente foi adicionado ao sedimento um volume de 400 μ L de tampão de extração (0,4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 2 mM EDTA pH 8,0) e homogenizado por 10 a 15 s. Após foi adicionado 40 μ L de sódio dodecil sulfato 20 % (SDS) e 8 μ L de Proteinase K 20 mg/mL (concentração final 400 μ g/mL) (Invitrogen®). As amostras foram incubadas em banho-maria a 55°C durante 1 hora e, em seguida foi adicionado 300 μ L de NaCl 6 M a cada uma. As amostras foram novamente agitadas em vórtex por 30 s e centrifugadas a $10.000 \times g / 10$ min. Ao sobrenadante foi adicionado 700 μ L de álcool isopropílico e incubado a -20°C por 1 hora. Após, a mistura foi centrifugada a $10.000 \times g / 10$ min. O DNA foi lavado com etanol 70 % e centrifugado a $10.000 \times g / 10$ min. Depois de seco à temperatura ambiente, o DNA foi ressuspensão em 100 μ L de água ultra-pura esterilizada e quantificado em gel de agarose.

3.7.2 Quantificação do DNA de *Acanthamoeba*

A quantificação do DNA dos isolados de *Acanthamoeba* foi realizada por comparação da intensidade das bandas, em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL. Como controle utilizou-se um padrão de peso molecular de concentração conhecida (DNA ladder 50 pb, Ludwig biotecnologia).

3.7.3 Reação em cadeia da polimerase – PCR

A PCR foi realizada para confirmar a presença do gênero *Acanthamoeba* nos 27 isolados de AVL estudados. Os oligonucleotídeos utilizados amplificam uma região de aproximadamente 450 pares de base denominado ASA.S1 do rDNA 18S, que é altamente específico para o gênero *Acanthamoeba* (Schroeder et al., 2001). Os iniciadores utilizados na reação foram:

JDP1 (forward): 5' - GGCCAGATCGTTTACCGTGAA -3'

JDP2 (reverse): 5' - TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA -3'

A reação da PCR, com base no protocolo de Booton et al. (2004) foi realizada em volume final de 50 µL, contendo 20-30 ng de DNA, 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen®), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo, tampão de reação (50 mM KCl₂, 10 mM Tris-HCl), 1,5 mM MgCl₂ e 1 U de Taq polimerase (Invitrogen®).

A PCR foi realizada em um termociclador “PTC 150 MiniCycler Hot Bonnet – MJ Research” programado para as condições de 94 °C por 1 min, 67 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e 72 °C por 5 min. Após, o produto da PCR foi

analisado em eletroforese com gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo (0,5 µM/mL) e visualizado em luz ultravioleta com um transluminador.

3.7.4 Purificação do produto da PCR

O produto da PCR foi purificado através do kit de purificação QIAquick® (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), seguindo as instruções do fabricante.

3.7.5 Sequenciamento e análise dos fragmentos

Os produtos da PCR purificados, de 10 isolados de água da torneira que foram positivos para o gênero *Acanthamoeba*, foram sequenciados utilizando o sequenciador automático MegaBace 1000. As 10 sequências do gene 18S rDNA foram registradas no banco de dados GenBank e comparadas com sequências nucleotídicas de espécies de *Acanthamoeba* já depositadas no banco, utilizando o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) a fim de classificar os isolados obtidos (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.8 Avaliação do potencial patogênico de isolados de *Acanthamoeba* através de testes de tolerância

Os isolados de *Acanthamoeba* spp. obtidos de amostras de água da torneira foram submetidos a testes de osmotolerância e termotolerância. Estes testes foram utilizados como marcadores na diferenciação de isolados patogênicos e não-patogênicos, como descrito por Khan e colaboradores (2001).

3.8.1 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 controle do crescimento. Aproximadamente 1000 trofozoítos foram inoculados no centro das placas, que 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 20 mm do ponto de inoculação. Para cada placa, cinco campos microscópicos foram quantificados (microscópio óptico, aumento de 100X). Todos os testes foram realizados em triplicata, com cada isolado de *Acanthamoeba* em uma placa individual. As contagens foram realizadas no décimo dia de incubação. Após as contagens, áreas das placas dos isolados submetidos às concentrações de 0,5 M e 1,0 M de manitol, foram marcadas e transferidas para placas de ágar não-nutriente 1,5 % com sobrecamada de *E. coli* e incubadas a 30°C para avaliação da viabilidade.

3.8.2 Teste de Termotolerância

Testes de tolerância à temperatura foram realizados em placas de ágar não-nutriente 1,5 % cobertas com suspensão de *E.coli* (ATCC 25922), onde cerca de 1000 trofozoítos foram inoculados no centro das placas que foram incubadas a 30, 37 e 42°C por até 10 dias. As placas submetidas a 30 °C foram utilizadas como controle na avaliação do crescimento. 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. Cinco campos microscópicos foram quantificados (microscópio óptico, aumento de 100X) em cada placa. Todos os testes foram realizados em triplicata, com cada isolado de *Acanthamoeba* em uma placa individual.

Após as contagens, áreas das placas, dos isolados submetidos às temperaturas de 37 e 42°C foram marcadas e transferidas para placas de ágar não-nutriente 1,5 % cobertas com suspensão de *E. coli* e incubadas a 30°C para avaliação da viabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento de AVL em água da torneira

Das 132 amostras de água da torneira de escolas do Estado RS analisadas, 27 (20,45%) indicaram a presença de AVL. A presença de protozoários de vida livre em água de torneira já foi relatada em outros estudos (Jeong et al., 2007; Boost et al., 2008; Edagawa et al., 2009; Bonilla-Lemus et al., 2010; Stockman et al., 2011;) inclusive no Brasil (Magliano et al., 2009).

As formas trofozoíticas foram observadas em microscópio óptico (100X), ao redor da membrana filtrante, entre 24 h e 48 h após o cultivo da amostra em placa e geralmente organismos contaminantes como bactérias e fungos estavam presentes junto ao crescimento das AVL (Figura 3). Subcultivos foram realizados para a obtenção de culturas monoxênicas transferindo uma pequena área de crescimento (um repique) para uma nova placa de cultivo facilitando a descontaminação. O fungo filamentosos foi o maior problema enfrentado na monoxenização das amostras, precisando muitas vezes realizar mais de um repique para a descontaminação do meio, tornando a fase de isolamento bastante trabalhosa. Essa dificuldade já foi relatada em estudos com amostras retiradas do ambiente (Tsvetkova et al., 2004). Schuster (2002) também observou que a maior dificuldade no isolamento de AVL é

estimular o crescimento das amebas e ao mesmo tempo inibir o crescimento de outros organismos contaminantes.

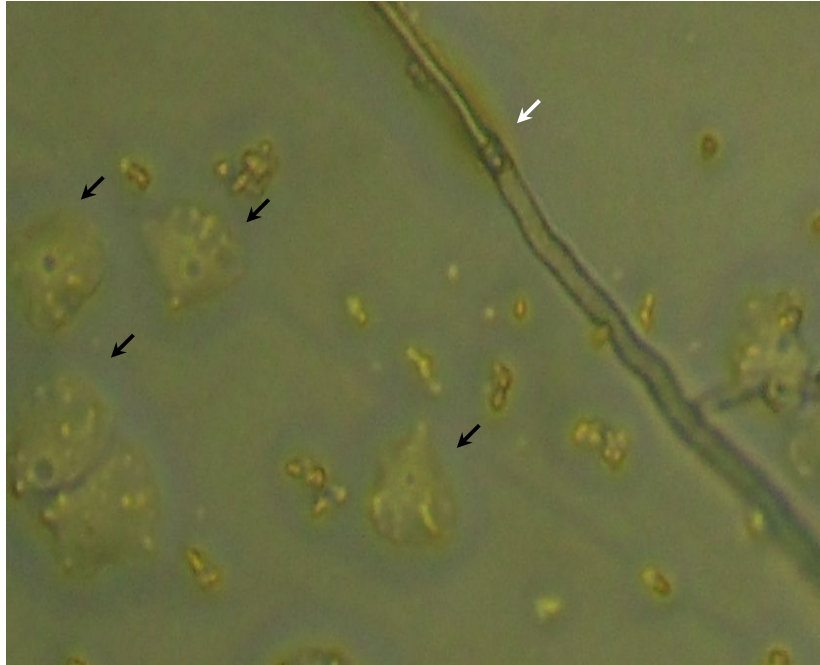


Figura 3 – Cultura de AVL em placa contaminada. Trofozoítos (seta preta) em ágar não-nutriente com contaminação de fungo filamentososo (seta branca). Microscópio óptico (100X).

4.2 Clonagem dos isolados

O procedimento de clonagem foi realizado com sucesso nas 27 amostras positivas para AVL, tornando os isolados homogêneos e evitando a presença de mais de uma linhagem nos cultivos. Após a clonagem as amebas continuaram sendo cultivadas em placas com ANN, dando continuidade aos processos de classificação (Figura 4).

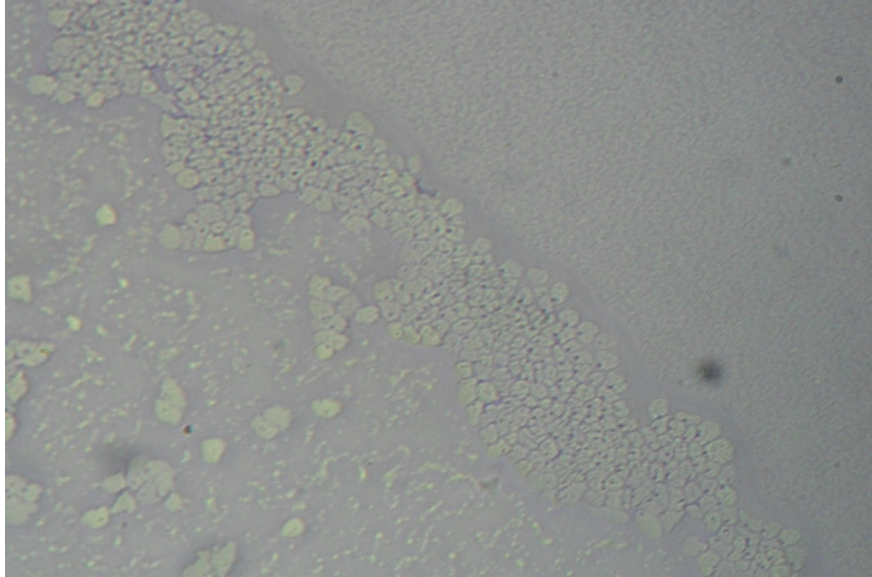


Figura 4 – Crescimento de AVL em ANN com *E. coli*.

4.3 Identificação morfológica dos isolados de AVL

Dos 27 isolados de AVL, 10 (37,03%) apresentaram características morfológicas de cistos e trofozoítos compatíveis com o gênero *Acanthamoeba*, segundo Pussard e Pons (1977) e Page (1988) (Tabela 2).

O tempo de contração do vacúolo pulsátil estabelecido para o gênero *Acanthamoeba* (De Carli, 2001), que varia de 45 a 50 segundos foi confirmado em seis isolados. Os isolados TW82, TW84, TW119 e TW125 tiveram tempo inferior ao estabelecido para o gênero. Entretanto, o isolado de referência *A. castellanii* Neff (30010) também obteve um tempo menor (Tabela 3).

Os trofozoítos foram reconhecidos pela sua locomoção lenta, citoplasma com zona periférica hialina, nucléolo bem definido, vacúolos pulsáteis e a presença de projeções aciculiformes, os chamados acantopódios (Figura 5).

Tabela 2 – Caracterização morfológica de isolados de AVL de água de torneira no Rio Grande do Sul – Brasil.

Isolados	Acesso GenBank	Fonte	Média Diâmetro dos Cistos ^a µm ± DP	Média Diâmetro dos Trofozoítos ^a µm ± DP	Grupo Morfológico (Russett & Pons, 1977)	Tempo de contração dos Vacúolos ^b ± DP
TW79	JF718255	AT	11,5 ± 1,4	14,3 ± 1,8	II	49,5 ± 3,6
TW80	JF718256	AT	11,9 ± 1,1	18,8 ± 1,8	II	45,4 ± 2,7
TW81	JF718257	AT	12,0 ± 1,3	14,8 ± 0,6	II	47,0 ± 3,4
TW82	JF718258	AT	11,8 ± 1,1	14,8 ± 0,4	II	40,6 ± 2,9
TW83	JF718259	AT	15,1 ± 0,3	17,0 ± 1,8	II	48,6 ± 1,5
TW84	JF718260	AT	12,5 ± 1,6	16,2 ± 1,0	III	39,2 ± 2,1
TW95	JF718261	AT	12,2 ± 0,4	16,4 ± 1,0	II	44,4 ± 3,2
TW119	JF718263	AT	16,0 ± 1,4	19,1 ± 1,5	II	35,4 ± 2,4
TW122	JF718264	AT	12,2 ± 1,5	15,7 ± 0,8	II	47,2 ± 2,5
TW125	JF718265	AT	13,2 ± 1,4	16,3 ± 1,6	II	35,2 ± 1,8
<i>A. castellanii</i> (ATCC 30010)		Solo	14,8 ± 1,0	16,7 ± 1,4	II	35,6 ± 2,4
<i>A. castellanii</i> (ATCC 50492)		Ceratite	12,4 ± 0,8	17,1 ± 1,5	II	49,6 ± 3,8

AT – Água de Torneira; DP – Desvio Padrão. ^a O estudo morfométrico foi determinado pela média da medida de 10 cistos e 10 trofozoítos de cada isolado. ^b A média do tempo de contração dos vacúolos pulsáteis foi estimado a partir da análise de cinco trofozoítos de cada isolado.

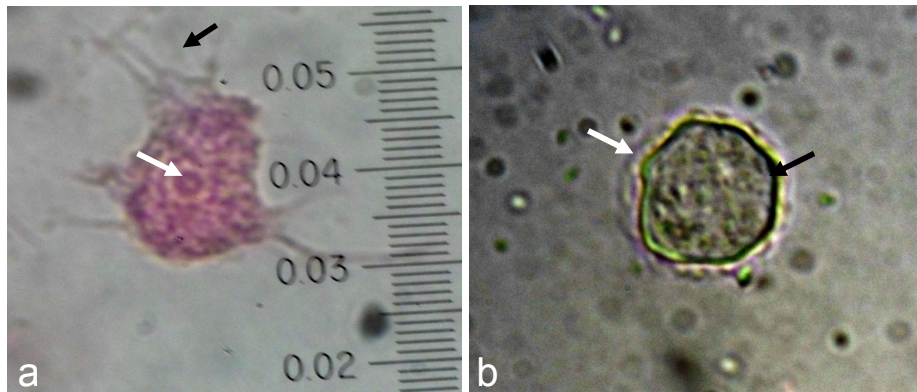


Figura 5 – Características do gênero *Acanthamoeba*. a) Trofozoíto com acantopódios (seta preta) e nucléolo evidente (seta branca) corado com tricrômico. b) Cisto com dupla parede: ectocisto (seta branca) e endocisto (seta preta) observado direto do material retirado da placa. Aumento 1000X.

A identificação dos cistos foi feita através da classificação de Pussard & Pons (1977), que divide o gênero *Acanthamoeba* em três grupos de acordo com características de tamanho e dos aspectos morfológicos gerais dos cistos. Dos 10 isolados, nenhum apresentou cistos com característica do grupo I. No grupo II, que representa as espécies mais comuns no ambiente (Page, 1967) foram identificados nove isolados com endocisto poliédrico e também globular (Figura 6). Dentro do grupo III foi classificado um isolado com endocisto arredondado e ectocisto levemente rugoso. (Figura 7).

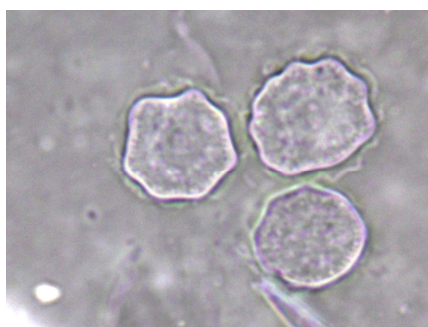


Figura 6 – Cistos do grupo II. Isolado de *Acanthamoeba* (TW81). Exame direto em solução salina. Microscópio óptico 1000X.



Figura 7 – Cistos do grupo III. Isolado de *Acanthamoeba* (TW84). Exame direto em solução salina. Microscópio óptico 1000X.

A caracterização apenas através da morfologia não é precisa, pois ocorrem dentro de um mesmo clone variações na forma do cisto (Page, 1988; Visvesvara, 1991; Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Silva & Rosa, 2003), sendo importante a classificação de caráter molecular.

4.4 Confirmação genotípica (PCR)

A amplificação da região ASA.S1 realizada em todos os 27 isolados de AVL de água de torneira com os oligonucleotídeos JDP1 e JDP2, confirmaram o gênero *Acanthamoeba* em 10 isolados (TW79, TW80, TW81, TW82, TW83, TW84, TW95, TW119, TW122 e TW125) anteriormente identificados como pertencentes ao mesmo gênero pelos aspectos morfológicos. A Figura 8 mostra alguns isolados que foram positivos e também negativos para o gênero *Acanthamoeba*.

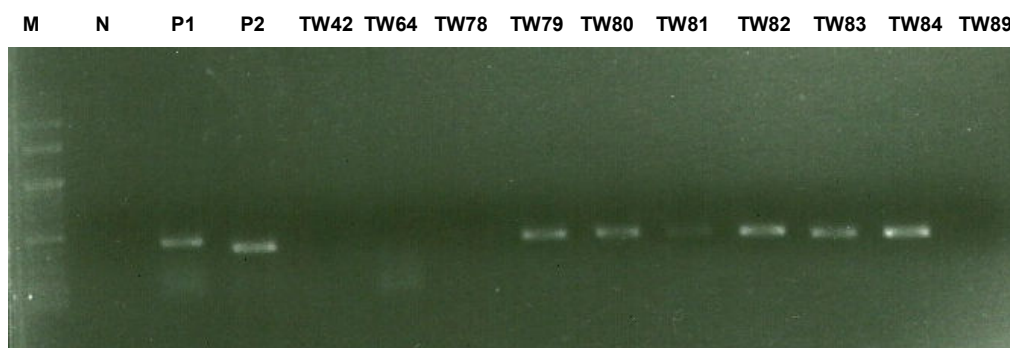


Figura 8 - Produtos de amplificação da PCR do fragmento ASA.S1 do gene 18S rDNA. (M) Marcador de peso molecular, (N) Controle negativo, (P) Controle Positivo: (P1) *A. polyphaga* (ATCC 30461) isolado clínico, (P2) *A. polyphaga* (ATCC 30782) isolado ambiental, (TW42-TW89) amostras ambientais de água da torneira.

4.5 Análise do sequenciamento

O resultado do sequenciamento dos produtos das PCR dos dez isolados pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*, foi comparado com

sequências nucleotídicas parciais do gene 18S rDNA depositadas no banco de dados GenBank utilizando o programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programa do US National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) a fim de buscar sequências similares.

A similaridade dos isolados entre sequências da mesma região gênica foi maior ou igual a 97% para espécies dentro do gênero *Acanthamoeba*, exceto para o isolado TW79 que teve 92% de similaridade quando comparado às sequências dispostas no GenBank (Tabela 3).

Todos os isolados, com exceção do TW95, tiveram de 92 a 100% de similaridade com espécies originadas de ambientes aquáticos e identificadas como *Acanthamoeba palestinensis*.

O isolado TW95, quando comparado à classificação por espécie na lista de referências do GenBank teve 98% de similaridade com *Acanthamoeba polyphaga*, mas a sua maior identidade (100%) está junto ao isolado classificado genotipicamente como pertencente ao grupo T4 com origem da córnea de um paciente com ceratite (Tabela 4). O grupo T4, além de ser o mais encontrado no ambiente (Booton et al., 2004, 2005) é também o genótipo associado à maioria das espécies causadoras de ceratite acantamebiana, dentre elas *Acanthamoeba polyphaga* (Marciano-Cabral E Cabral, 2003; Booton et al, 2005; Visvesvara et al, 2007)

No Brasil, um estudo com 19 amostras de água de torneira oriundas da região metropolitana de São Paulo, identificou um isolado pertencente ao gênero *Acanthamoeba*. A análise morfológica revelou características compatíveis com o grupo II e após a análise molecular obteve 99% de similaridade com a espécie *A. polyphaga* (ATCC 30461) e com o genótipo T4

(Magliano et al., 2009), além disso foi considerada patogênica de acordo com os testes de osmotolerância e devido à produção de enzimas proteolíticas.

Tabela 3 – Comparação da região gênica dos isolados deste estudo com espécies do gênero *Acanthamoeba* publicadas no GenBank*.

Isolados	Espécies comparadas	Similaridade	Registro no <i>GenBank</i>
TW79	<i>A. palestinensis</i>	92%	GU597002, GU573874
TW80	<i>A. palestinensis</i>	99%	GU597006, GU573874
TW81	<i>A. palestinensis</i>	100%	GU597010, GU573874
TW82	<i>A. palestinensis</i>	99%	GU597011, GU597012
TW83	<i>A. palestinensis</i>	98%	GU597010, GU597011
TW84	<i>A. palestinensis</i>	99%	GU597006, GU573874
TW95	<i>A. polyphaga</i>	98%	GU596994
TW119	<i>A. palestinensis</i>	97%	GU597013, GU573874
TW122	<i>A. palestinensis</i>	98%	GU597006, GU573874 GU597002
TW125	<i>A. palestinensis</i>	99%	GU597006, GU573874

* Dados analisados no site NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) em 05/03/2011.

A espécie *A. palestinensis* identificada em 90% dos isolados do presente trabalho, não está usualmente relacionada às espécies responsáveis por causarem doenças em humanos (Schaumberg et al., 1998; Walochnik et al., 2000a; Marciano-Cabral & Cabral, 2003), porém já foi citado por Walochnik

e colaboradores (2000b) a similaridade de 97,7% de *A. palestinensis* com um isolado clínico de ceratite acantamebiana do genótipo T6.

Neste estudo, os genótipos T2 e T6 foram os mais prevalentes conforme mostra a Tabela 5. Os isolados TW80, TW84, TW119 e TW125 apresentaram similaridade T2/T6 devido à grande semelhança de suas sequências (Walochnik et al., 2000b).

Assim, nossos dados estão de acordo com o trabalho desenvolvido por Maghsood et al. (2005), que avaliaram a distribuição do genótipo T2 em um estudo com 12 amostras de ambientes aquáticos e 13 isolados clínicos de pacientes com ceratite acantamebiana. Desta forma, o estudo revelou 23% de positividade para este genótipo nos isolados clínicos e 58,3% nos isolados ambientais, demonstrando pela primeira vez a relação da patogenicidade do grupo T2 e sua prevalência. O genótipo T2 também já foi identificado como o agente causador das lesões cutâneas e da encefalite amebiana granulomatosa em um paciente imunodeprimido (Walochnik et al., 2008).

Em um estudo realizado por Edagawa e colaboradores (2009), no Japão, trinta e sete amostras de água oriundas de estações de tratamento e também de rios revelaram a presença de *Acanthamoeba* spp. após teste molecular. Os isolados foram assim classificados: 56,8% pertenciam ao genótipo T3; 13,5% ao genótipo T4; 8,1% ao grupo T5 e o restante dos isolados (18,9%) eram do grupo T13.

Em um trabalho desenvolvido no México (2010), 200 amostras de água de torneira foram coletadas em 27 casas de usuários de lentes de contato e o resultado indicou uma prevalência de 22,5% do gênero *Acanthamoeba*. A maioria dos isolados, semelhante ao achado deste trabalho, eram pertencentes

ao grupo II de acordo com a morfologia dos cistos e revelaram baixo nível de virulência após testes de patogenicidade *in vivo* (Bonilla-Lemus et al., 2010).

No estudo realizado por Boost e colaboradores (2008) em Hong Kong, a análise de água da torneira de um total de 100 casas resultou em 10% de positividade para o gênero *Acanthamoeba*, enquanto a presença de 51% de *Acanthamoeba* foi verificada em amostras de água de torneira em Ohio nos EUA. (Stockman et al, 2010).

Um estudo realizado no Reino Unido, com o objetivo de determinar a importância da água de torneira como fonte de contaminação da ceratite acantamebiana, foi desenvolvido na casa de 27 pacientes acometidos com a doença. Seis isolados clínicos de *Acanthamoeba* spp. tiveram um perfil genético idêntico aos isolados da água de torneira da casa dos respectivos pacientes (Kilvington et al., 2004). No Japão, uma análise clínica sobre nove pacientes com ceratite por *Acanthamoeba* revelou que todos higienizavam seus estojos de lentes de contato com água da torneira (Mutoh et al., 2010).

A ceratite por *Acanthamoeba* está fortemente associada à falta de higiene e ao mau uso de lentes de contato por seus usuários. A associação da água de torneira durante a limpeza, mesmo acidentalmente, pode contaminar estojos e lentes de contato representando uma fonte de infecção (Marcio-Cabral & Cabral, 2003; Visvesvara et al., 2007). Além disso, espécies de *Acanthamoeba* isoladas da água de torneira já revelaram carrear bactérias em seu interior (Choi et al., 2009), como a espécie *Pseudomonas aeruginosa* responsável por infecções oculares (Walochnik et al., 1999).

No Rio grande do Sul, Brasil, uma pesquisa sobre a frequência de *Acanthamoeba* spp. em 13 isolados de água de piscinas revelou que nove

pertenciam ao grupo T5, três ao grupo T4 e um ao grupo T3 (Caumo e Rott, 2011). Os estudos até agora demonstram uma diversidade em relação à frequência destes grupos mostrando a necessidade de uma classificação mais consistente e a continuidade dos estudos sobre a sua distribuição global.

Tabela 4 – Análise da similaridade entre as sequências parciais do gene 18S rDNA de *Acanthamoeba* dos isolados de água de torneira deste estudo e das registradas no GenBank*.

ISOLADO	SIMILARIDADE	N° ACESSO GENBANK	GENÓTIPO**
TW79	92%	GU597002	T2
TW80	99%	GU597006 GU573874	T2 T6
TW81	100%	GU597010	T2
TW82	99%	GU597011	T2
TW83	98%	GU597011	T2
TW84	99%	GU597006 GU573874	T2 T6
TW95	100%	FJ042640	T4
TW119	97%	GU597013 GU573874	T2 T6
TW122	98%	GU573874	T6
TW125	99%	GU597006 GU573874	T2 T6

* Dados analisados no site NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) em 05/03/2011.

** Genotipagem para espécies do gênero *Acanthamoeba* segundo Stothard et al., 1998.

Todos os dados acima mostram que a prevalência de *Acanthamoeba* em água de torneira é bastante variável e que resistem aos tratamentos para obtenção de água potável, constituindo um fator relevante quando se associa a higienização das lentes de contato pelos seus usuários.

4.6 Análise do potencial de patogenicidade dos isolados de *Acanthamoeba*

Os isolados obtidos neste estudo foram submetidos a duas diferentes temperaturas e também a duas concentrações de manitol. Estes testes de osmo e termotolerância, estabelecidos por Khan e colaboradores (2001) tem o objetivo de analisar o potencial de patogênico dos isolados (Tabela 5).

Os cinco isolados (TW79, TW81, TW82, TW83 e TW122) que cresceram à temperatura de 37°C e à concentração de 0,5M de manitol foram considerados como não patogênicos. Porém, acredita-se que possua condições de resistir à temperatura corporal do ser humano (37°C), sendo considerado como um pré-requisito à patogenicidade em relação à encefalite amebiana granulomatosa. Além disso, tem condições de sobrevivência à temperatura média do ambiente ocular, que é de 34 °C (Walochnik et al., 2000b).

Os isolados TW80, TW84, TW119 e TW125 cresceram à temperatura de 37°C e a concentrações de 0,5 e 1M de manitol, sendo considerados isolados patogênicos, mas com baixo potencial. A mesma classificação patogênica foi aplicada ao isolado TW95, que resistiu às

temperaturas 37°C e 42°C, além de crescer à concentração de 0,5M de manitol.

Todos os isolados foram considerados viáveis, pois foram capazes de recobrar o crescimento em cultivos monoxênicos a 30°C.

Tabela 5 - Diferenciação da patogenicidade de isolados de *Acanthamoeba* por testes de tolerância.

Isolados	Temperatura de Crescimento		Crescimento em Manitol		Patogenicidade*
	37°C	42°C	0,5M	1M	
TW79	+	-	+	-	Não patogênico
TW80	+	-	+	+	Baixo potencial patogênico
TW81	+	-	+	-	Não patogênico
TW82	+	-	+	-	Não patogênico
TW83	+	-	+	-	Não patogênico
TW84	+	-	+	+	Baixo potencial patogênico
TW95	+	+	+	-	Baixo potencial patogênico
TW119	+	-	+	+	Baixo potencial patogênico
TW122	+	-	+	-	Não patogênico
TW125	+	-	+	+	Baixo potencial patogênico
ATCC ^a	+	+	+	+	Potencialmente patogênico

(-) Ausência de crescimento de *Acanthamoeba*; (+) Crescimento de *Acanthamoeba*. Avaliação feita em cinco campos microscópicos (100X).

* Critérios estabelecidos por Khan et al., 2001.

^a Isolado de referência *A. castellanii* T4 (ATCC 50492).

Gianninazzi e colaboradores (2009) estudaram a ocorrência de AVL em ambientes aquáticos na Suíça e revelaram a presença do gênero *Acanthamoeba* em um isolado de água de piscina. Este não apresentou toxicidade em testes com células de fibroblastos murinos e também não teve crescimento à temperatura de 42°C. Portanto, o isolado foi caracterizado como não patogênico.

A espécie *Acanthamoeba healyi* identificada em águas de piscinas termais na Suíça, resistiu ao crescimento à temperatura de 42°C e também

exibiu marcante citotoxicidade aos testes de patogenicidade *in vitro* e em *in vivo* sendo atribuído ao isolado, potencial patogênico para indivíduos imunodeprimidos (Gianinazzi et al., 2009).

Para corroborar a importância de testes de osmo e termotolerância, De Jonckheere (1983) e Khan e colaboradores (2002) demonstraram que isolados patogênicos de *Acanthamoeba* spp. revelam características de resistência a estes testes, dando relevância aos mesmos.

5 CONCLUSÃO

No RS, este é o primeiro trabalho que investiga e caracteriza a distribuição de AVL do gênero *Acanthamoeba* em isolados de água de torneira. A presença de espécies deste protozoário em água tratada revela sua importância epidemiológica, uma vez que está em contato direto com o ser humano, destacando a relevante característica de carrear bactérias e vírus patogênicos, sendo considerado o “Cavalo de Tróia” do mundo microbiano.

A falta de higiene, o uso inadequado e a relação da água de torneira com os estojos e as lentes de contato, resultam em um forte risco para a aquisição da ceratite por *Acanthamoeba*.

A identificação morfológica através dos cistos demonstrou ser uma ferramenta ainda importante na análise dos isolados quando não se utiliza o sequenciamento genético como ferramenta para classificação. Entretanto, a associação do estudo molecular e morfológico destes isolados ambientais, auxiliaria em uma classificação mais consistente.

A frequência dos grupos genotípicos dos dez isolados deste presente estudo foi distribuída entre os perfis T2, T4 e T6, onde quatro isolados tiveram mesma similaridade entre os grupos T2/T6. O grupo T4 é o mais encontrado no ambiente e o mais associado à ceratite acantamebiana, já os perfis T2 e o T6,

mesmo já sendo citados como patogênicos, não são normalmente identificados no meio ambiente. Por isso a importância da continuidade da classificação molecular desses isolados ambientais, que darão informações importantes sobre a distribuição de *Acanthamoeba* no ambiente e sua relação com os casos clínicos, determinando sua patogenicidade.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKSOZEK, A.; McCLELLAN, K.; HOWARD, K.; NIEDERKORN, J.Y.; ALIZADEH, H. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical and radiological conditions. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 88, p. 621-623, jun. 2002.

ALVES, Daniella de Souza Mendes Moreira. **Isolamento e caracterização morfológica de amebas de vida livre em amostras de solo e água de piscinas no distrito federal**. Brasília, 2006. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília.

ALVES, J.M.; GUSMAO, C.X.; TEIXEIRA, M.M.; FREITAS, D.; FORONDA, A.S.; AFFONSO, H.T. Random amplified polymorphic DNA profiles as a tool for the characterization of Brazilian Keratitis isolates of the genus *Acanthamoeba*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 33, p. 19-26, jan. 2000.

ARMSTRONG, M. The pathogenesis of human *Acanthamoeba* infection. **Infectious Disease Review**, Florida, v. 2, p. 65-73, 2000.

BARBEAU, J.; BUHLER, T. Biofilmes augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. **Research in Microbiology**, Paris, v. 152, p. 753 - 760, oct. 2001.

BARKER, J.; BROWN, M.R. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. **Microbiology**, Reading, v. 140, p. 1253-1259, jun. 1994.

BONILLA-LEMUS, P.; RAMÍREZ-BAUTISTA, G.A.; ZAMORA-MUÑOZ, C.; IBARRA-MONTES, R.; RAMÍREZ-FLORES, E.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, M.D. *Acanthamoeba* spp. in domestic tap water in houses of contact lens wearers in the metropolitan area of Mexico City. **Parasitology Research**, Berlin, v. 126, n. 1, p. 54-58, sep. 2010.

BOOST, M.; CHO, P.; LAI, S.; SUN, W.M. Detection of *Acanthamoeba* in tap water and contact lens cases using polymerase chain reaction. **Optometry and Vision Science**, Columbus, v. 85, n. 7, p. 526-530, jul. 2008.

BOOTON, G.C.; ROGERSON, A.; BONILLA, T.D.; SEAL, D.V.; KELLY, D.J.; BEATTIE, T.K.; TOMLINSON, A.; LARES-VILLA, F.; FUERST, P.A.; BYERS, T.J. Molecular and physiological evaluation of subtropical environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. causal agent of *Acanthamoeba* keratitis. **The Journal Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 51, p. 192-200, mar-apr. 2004.

BOOTON, G.C.; VISVESVARA, G.S.; BYERS, T.J.; Kelly, D.J.; Fuerst P.A. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Parkville, v. 43, p. 1689-1693, apr. 2005.

BOWERS, B.; KORN E.D. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 39, p. 95-111, oct. 1968.

BYRNE, K.A.; BURD, E.M.; et al. **Diagnostic microbiology and cytology of the eye**. Washington: Butterworth-Heinemann, 199 p., 1995.

CAUMO, K.; FRASSON, A.P.; PENS, C.J.; PANATIERI, L.F.; FRAZZON, A.P.G.; ROTT, M.B. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 103, n. 6, p. 477-485, sep. 2009.

CAUMO, K.; ROTT, M.B. *Acanthamoeba* T3, T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 117, n. 3, p. 233-235, mar. 2011.

CARLESSO, A. M.; ARTUSO, G. L.; CAUMO, K.; ROTT, M. B. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. **Current Microbiology**, New York, v. 60, n. 3, p. 185-190, mar. 2010.

CHAPPELL, C.L.; JOHN, W.A.; RIGHT, C.M.; NEWSOME, A. L. Standardized method of measuring *Acanthamoeba* antibodies in sera from healthy human subjects. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 8, p. 724-730, jul. 2001.

CHOI, S.H.; CHO, M.K.; AHN, S.C.; LEE, J.E.; LEE, J.S.; KIM, D.H.; XUAN, Y.H.; HONG, Y.C.; KONG, H.H.; CHUNG, D.I.; YU, H.S. Endosymbionts of *Acanthamoeba* isolated from domestic tap water in Korea. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 47, p. 337-344, dec. 2009.

CIRILLO, J.D.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L.S. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, p. 3254-3261, aug. 1994.

CORSARO, D.; VENDITTI, D. Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa. Acanthamoebida). **Parasitology Research**, Berlin, v. 107, p. 233-238, jun. 2010.

COSTAS, M.; GRIFFITHS, A.J. Enzyme composition and the taxonomy of *Acanthamoeba*. **The Journal of Protozoology**, New York, v. 33, n.4, p. 604–607, nov. 1985.

CULBERTSON, C.G.; SMITH, J.; MINNER, J. *Acanthamoeba*: Observation on animal pathogenicity. **Science**, Washington, p. 127-1506, jun. 1958.

CURSONS, R.T.M.; BROWN, T.J.; KEYS, E.A. Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae: in axenic condition. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, n. 40, p. 62-66, jul. 1980.

DE JONCKHEERE J.F. Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing and taxonomy of the genus *Acanthamoeba*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Laurence, v. 30, p. 701-706, 1983.

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

DUARTE, Juliana Lúcia. **Caracterização morfológica, molecular e fisiológica de isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba***. Paraná, 2010. 85 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia). Departamento de Patologia Básica. Universidade Federal do Paraná.

EDAGAWA, A.; KIMURA, A.; KAWABUCHI-KURATA, T.; KUSUHARA, Y.; KARANIS, P. Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. **Parasitology Research**, Berlin, v. 105, n. 4, p. 1109-1117, oct. 2009.

ETTINGER, M.R.; WEBB, S.R.; HARRIS, S.A.; MCININCH, S.P.; GARMAN, G.; BROWN, B.L.; Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA. **Parasitology Research**, Berlin, v. 89, p. 6-15, jan. 2003.

EY, T.U.; JOSLIN, C.E.; SUGAR, J.; BOOTON, G.C.; SHOFF, M.E.; FUERST, P.A. The relative value of confocal microscopy and superficial corneal scrapings in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. **Cornea**, v. 27, n. 7, p. 764-772, aug. 2008.

FERRANTE, A. Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. **Parasite Immunology**, London, v.13, p. 31-47, jan. 1991.

FORONDA A.S. **Tratado de infectologia**. São Paulo, Atheneu, 1996, v. 2, p. 1160-1166.

GARCIA, L.S.; BRÜCKNER, D.A. **Diagnostic Medical Parasitology**. 3. ed., Washington, 1997, 937 p.

GAST, R.J. Development of *Acanthamoeba*- specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Laurence, v. 48, n. 6, p. 609 – 615, nov-dec. 2001.

GIANINAZZI, C.; SCHILD, M.; WÜTHRICH, F.; MÜLLER, N.; SCHURCH, N.; GOTTSTEIN, B. Potentially human pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a heated indoor swimming pool in Switzerland. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 121, p. 180-186, feb. 2009.

GIAZZI JF. **Contribuição para o estudo do isolamento, cultivo e manutenção das amebas de vida livre** [Tese de livre-docência]. Araraquara, 1996. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP.

GÓRNIK, K.; KUZNA-GRYGIEL, W. Presence of virulent strains of amphizoic amoebae in swimming pools of the city of Szczecin. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Poland, v. 11, p. 233-236, 2004.

GREUB G.; RAOULT, D. Micoorganisms resistant to free-living amoebae. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, p. 413-433, apr. 2004.

HEWETT, M.K.; ROBINSON, B.S.; MONIS, P.T.; SAINT, C.P. Identification of a new *Acanthamoeba* 18SrRNA gene sequence type, corresponding to the species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara, 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae). **Acta Protozoologica**, Warszawa, v. 42, p. 325-329, may 2003.

HORN, M.; FRITSCH, T.R.; GAUTOM, R.K.; SCHLEIFER, K.H.; WAGNER, M. Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 1,n.4, p. 357-367, aug. 1999.

ILLINWORTH, C.D.; COOK, S.D. *Acanthamoeba* keratitis. **Survey of Ophthalmology**, v. 42, p. 493-508, may-jun. 1998.

JAHNES, B.; FULLMER, H.M.; LI, C.P. Free-living amoebae as contaminants in monkey kidney tissue cultures. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Cambridge, v. 96, n. 2, p. 484 - 488, nov. 1957.

JEONG, H.J.; LEE, S.J.; KIM, J.H.; XUAN, Y.H.; LEE, K.H.; PARK, S.K.; CHOI, S.H.; CHUNG, D.I.; KONG, H.H.; OCK, M.S.; YU, H.S. *Acanthamoeba*: keratopathogenicity of isolates from domestic tap water in Korea. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 117, n. 4, p. 357-367, dec. 2007.

JONES, D.B.; VISVESVARA, G.S.; ROBINSON, N.R. (1975) *Acanthamoebae polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. **Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom**, London, v. 1075, p. 221-232, jul, 1975.

KHAN, N.A.; JARROL, E.L.; PANJWANI, N.; CAO, Z.; PAGET, T.A. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and non-pathogenic species of *Acanthamoeba*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 2858-286, aug. 2000.

KHAN, N.A.; JARROLL, E. L.; PAGET, T. A. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. **Current Microbiology**, New York, v. 43, p. 204-208, sep. 2001.

KHAN, N. A; JARROLL, E. L; PAGET, T. A. Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. **Current Microbiology**, New York, v. 45, n. 3, p. 197-202, sep. 2002.

KHAN, N.A. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 34, p. 277-285, jun. 2003.

KHAN, N.A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiology Review**, London, v.30, p. 564-595, may 2006.

KILVINGTON, S. Moist-heat disinfection of *Acanthamoeba* cysts. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 13, p. 418, mar-apr. 1991.

KILVINGTON, S.; BEECHING, J. Development of a PCR for identification of *Naegleria fowleri* from the environment. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 3764-3767, oct. 1995.

KILVINGTON, S.; GRAY, T.; DART, J.; MORLET, N.; BEECHING, J.R.; FRAZER, D.G.; MATHESON, M. *Acanthamoeba* keratitis: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Brookline, v. 45, p. 165-169, jan. 2004.

KIM, Y.H.; OCK, M.S.; YUN, H.C.; HWANG, M.Y.; YU, H.S.; KONG, H.H.; CHUNG, D.I. Close relatedness of *Acanthamoeba pustulosa* with *Acanthamoeba palestinensis* based on isoenzyme profiles and rDNA PCR-RFLP patterns. Korean. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 34, n. 4, p. 259–266, dec. 1996.

KINGSTON, D.; WARHURST, D.C. Isolation of amoebae from the eye. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 2, p. 27-36, 1969.

KODET, R.; NOHYNKOVA, E.; TICHY, M.; SOUKUP, J.; VISVESVARA, G. Amebic encephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris* a Czech child: description of the first case from Europe. **Pathology Research and Practice**, Stuttgart, v. 194, p. 2423-2429, 1998.

KONG, H.H.; PARK, J.H.; CHUNG, D.I. Interstrain polymorphisms of isoenzyme profiles and mitochondrial DNA fingerprints among seven strains assigned to *Acanthamoeba polyphaga*. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 33, n. 4, p. 331–340, 1995.

LACKNER, P.; BEER, R.; BROESSNER, G.; HELBOK, R.; PFAUSLER, B.; BRENNEIS, C.; AUER, H.; WALOCHNIK, J.; SCHMUTZHARD, E. Acute granulomatous *Acanthamoeba* encephalitis in an immunocompetent patient. **Neurocritical Care**, Minneapolis, v. 12, n. 1, p. 91-94, feb. 2010.

LEHMANN, O.J.; GREEN, S.M.; MORLET, N.; KILVINGTON, S.; KEYS, M. F.; MATHESON, M.M.; DART, J.K.; MCGILL, J.I.; WATT, P.J. Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Brookline, v. 39, p. 1261-1265, jun 1998.

LORENZO-MORALES, J.; MONTEVERDE-MIRANDA, C.A.; JIMÉNEZ, C.; TEJEDOR, M.L.; VALLADARES, B.; ORTEGA-RIVAS, A. Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Lublin, v. 12, p. 233-236, 2005a.

LORENZO-MORALES, J.; LINDO, J.F.; MARTINEZ, E.; CALDER, D.; FIGUERUELO, E.; VALLADARES, B.; ORTEGA-RIVAS, A. Pathogenic *Acanthamoeba* strains from water sources in Jamaica, West Indies. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Abingdon Carfax, v. 99, p. 751-758, dec. 2005b.

LORENZO-MORALES, J.; ORTEGA-RIVAS, A.; MARTÍNEZ, E.; FORONDA, P.; VALLADARES, B. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. **Parasitology Research**, Berlin, v. 95, p. 273-277, mar. 2005c.

LORENZO-MORALES, J.; ORTEGA-RIVAS, A.; MARTÍNEZ, E.; KHOUBBANE, M.; ARTIGAS, P.; PERIAGO, M.V.; FORONDA, P.; ABREU-ACOSTA, N.; VALLADARES, B.; MAS-COMA, S. *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental freshwater samples in the Nile Delta region, Egypt. **Acta tropica**, Netherlands, v. 100, p. 63-69, nov. 2006.

MAGHSOOD, A.H.; SISSONS, J.; REZAIAN, M.; NOLDER, D.; WARHURST, D.; KHAN, NA. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 54, p. 755-759, aug. 2005.

MAGLIANO, A. C. M.; SILVA, F. M.; TEIXEIRA, M. G.; ALFIERI, S. C. Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. isolated from tap water in Brazil. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 123, n. 3, p. 231-235, nov. 2009.

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

MARTINEZ, A.J.; JANITSCHKE, K. *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism: a review. **Infection**, v. 13, p. 251-256, nov-dec. 1985.

MARTINEZ, A.J.; VISVESVARA, G.S. Laboratory diagnosis of pathogenic freeliving amoebas: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, and *Leptomyxida*. **Clinics in Laboratory Medicine**, v.11, p. 861-872, dec. 1991.

MARTINEZ, A. J.; VISVESVARA, G. S. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. **Brain Pathology**, Pittsburgh, v. 7, n. 1, p. 583–598, jan. 1997.

MAZUR, T. E.; HADAS, I.; IWANICKA. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. **Tropical Medicine and Parasitology**, New York, v. 46, p. 106–108, jun. 1995.

MUTOH, T.; ISHIKAWA, I.; MATSUMOTO, Y.; CHIKUDA, M. A retrospective study of nine cases of *Acanthamoeba* keratitis. **Clinical Ophthalmology**, Auckland, v. 21, p. 1189-1192, oct. 2010.

NAGINGTON, J.; WATSON, P. G.; PLAYFAIR, T. J.; MCGILL, J.; JONES, B. R.; STEELE, A. D. Amoebic infections of the eye. **Lancet**, London, v. 28, n. 2, p. 1537–1540, dec. 1974.

NIEDERKORN, J.Y.; ALIZADEH, H.; LEHER, H.F.; McCULLEY, J.P. The immunobiology of *Acanthamoeba* keratitis. **Springer Seminars in Immunopathology**, Dallas, v. 21, n. 2, p. 147-160, jun. 1999.

ODOM, A., DEL-POETA, M., PERFECT, J., HEITMAN, J. The immunosuppressant FK506 and its nonimmunosuppressive analog L-685,818 are toxic to *Cryptococcus neoformans* by inhibition of a common target protein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 41, p. 156–161, jan. 1997.

PAGE, F.C. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. **The Journal of Protozoology**, New York, v. 14, n. 4, p. 709–724, nov. 1967.

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

PARIJA, S. C., PRAKASH M.R., RAO, V.A.; VELLANIPARAMBIL, R.J. *Acanthamoeba* keratitis in Pondicherry. **Journal of Communicable Diseases**, Delhi, v. 33, p. 126–129. 2001.

PASZKO-KOLVA, C.; YAMAMOTO, M.; SHAHAMAT, M.; SAWYER, T.K.; MORRIS, G.; COLWELL, R.R. Isolation of amoebae and *Pseudomonas* and *Legionella* spp. from eyewash stations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 163-167, jan. 1991.

PENS, C.; COSTA, M.; FADANELLI, C.; CAUMO, K.; ROTT, M. B. *Acanthamoeba* spp. and bacterial contamination in contact-lens storage cases and the relationship to user profiles. **Parasitology Research**, Berlin, v. 103, p.1241-1245, nov. 2008.

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

QVARNSTROM, Y.; VISVESVARA, G.S.; SRIRAM, R.; SILVA, A.J. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. **Journal of Clinical Microbiology**, Parkville, v. 44, p. 3589-95, oct. 2006.

RADFORD, C.; LEHMAN, O.; DART, J.K.G. *Acanthamoeba* keratitis: multicentre survey in England 1992-6. **The British journal of ophthalmology**, London, v. 82, p. 1387-1392, dec. 1998.

ROHR, U.; WEBER, S.; MICHEL, R.; SELENKA, F. WILHELM, M. Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 1822-1824, may, 1998.

SALAH, M.; ICIAR, M. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, nov. 1997.

SANGRUCHI, T.; MARTINEZ, A.J.; VISVESVARA, G.S. Spontaneous granulomatous amebic encephalitis: report of four cases from Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health**, Bangkok, v. 25, p. 309-373, jun. 1994.

SCHAUMBERG, D.A.; SNOW, K.K.; DANA, M.R. The epidemic of *Acanthamoeba* keratitis: Where do we stand? **Cornea**, v. 17, p. 3-10, jan. 1998.

SCHMITZ-ESSER, S.; TOENSHOFF, E.R.; HAIDER, S.; HEINZ, E.; HOENNINGER, V.M.; WAGNER, M.; HORN, M. Diversity of bacterial endosymbionts of environmental *acanthamoeba* isolates. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 5822-5831, sep. 2008.

SCHROEDER, J.M.; BOOTON, G.C.; HAY, J.; NISZL, I.A.; SEAL, D.V.; MARKUS, M.B.; FUERST, P.A.; BYERS, T.J. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 1903-1911, may 2001.

SCHUSTER, F.L. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amoebas. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, p. 342-354, jul. 2002.

SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. Free-living amoebae as opportunistic and nonopportunistic pathogens of humans and animals. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, p. 1001-1027, aug. 2004.

SHARMA, S.; GARG, P.; RAO, G.N. Patient characteristics, diagnosis, and treatment of noncontact lens related *Acanthamoeba* keratitis. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 84, p. 1103-1108, oct. 2000.

SILVA, M. A.; ROSA, J. A. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, p. 242-246, apr. 2003.

SINGHAL, T.; BAJPAI, A.; KALRA, V.; KABRA, S.K.; SAMANTARAY, J.C.; SATPATHY, G.; GUPTA, A.K. Successful treatment of *Acanthamoeba* meningitis with combination oral antimicrobials. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 20, p. 623–627, jun. 2001.

STOCKMAN, L.J.; WRIGHT, C.J.; VISVESVARA, G.S.; FIELDS, B.S.; BEACH, M.J. Prevalence of *Acanthamoeba* spp. and other free-living amoebae in household water, Ohio, USA 1990-1992. **Parasitology Research**, Berlin, v. 108, n. 3, p. 621-627, mar. 2011.

STOTHARD, D.R.; SCHROEDER-DIEDRICH, J.M.; AWWAD, M.H.; GAST, R.J.; LEDEE, D.R.; RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S.; DEAN, C.L.; FUERST, P.A.; BYERS, T.J. 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, jan-fev. 1998.

THOMAS, V.; HERRERA-RIMANN, K.; BLANC, D. S.; GREUB, G. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 2428-2438, apr. 2006.

TSVETKOVA, N.; SCHILD, M.; PANAIOTV, S.; KURDOVA-MINTCHEVA, R.; GOTTSTEIN, B.; WALOCHNIK, J.; ASPOCK, H.; LUCAS, M.S.; MULLER, N. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. **Parasitology Research**, Berlin, v. 92, p. 405-413, mar. 2004.

TURNER, N.A.; HARRIS, A. D.; LLOYD, D. Observation microbial differentiation an changes in susceptibility to antimicrobial agents. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, p. 751, nov. 2000.

VISVESVARA, G.S.; SHER-GREEN, J. Epidemiology of free-living ameba infection. **The Journal of Protozoology**. New York, v. 37, p. 25-33, jul-aug. 1990.

VISVESVARA, G.S. Classification of *Acanthamoeba*. **Reviews of infectious diseases**, Chicago, v. 13, p. 369-372, mar-apr. 1991.

VISVESVARA, G. S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Georgia, v. 50, n. 1, p. 1-26, jun. 2007.

VISVESVARA, G.S.; SCHUSTER, F.L. Opportunistic Free-living Amebae, Part I. **Clinical Microbiology Newsletter**, Boston, v. 30, p. 151-158, oct. 2008.

VISVESVARA, G.S.; SHOFF, M.E.; SRIRAM, R.; BOOTON, G.C.; CRARY, M.; FUERST, P.A.; HANLEY, C.S.; GARNER, M.M. Isolation, morphologic, serologic and molecular identification of *Acanthamoeba* T4 genotype from the liver of a Temminck's tragopan (*Tragopan temminckii*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 24, n. 170, p. 197-200, jun. 2010.

WALOCHNIK, J.; HASSL, A.; SIMON, K.; BENYR, G.; ASPOCK, H. Isolation and identification by partial sequencing of the 18S ribosomal gene of free-living amoebae from necrotic tissue of *Basilliscus plumifrons* (Sauria: Iguanidae). **Parasitology Research**, Berlin, v. 85, n. 7, p. 601–603, jul. 1999.

WALOCHNIK, J.; OBWALLER, A.; ASPÖCK, H. Correlations between morphological, molecular, biological and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 4408–4413, oct. 2000a.

WALOCHNIK J.; HALLER-SCHOBER E.M; KÖLLI, H.; PICHER, O.; OBWALLER, A.; ASPÖCK, H. Discrimination between clinically relevant and nonrelevant *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens-wearing keratitis patients in Austria. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 3932–3936, nov. 2000b.

WALOCHNIK, J.; AICHELBURG, A.; ASSADIAN, O.; STEUER, A.; VISVESVARA, G.; VETTER, N.; ASPÖCK, H. Granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* amoebae of genotype T2 in a human immunodeficiency virus-negative patient. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 46, n. 1, p. 338–340, jan. 2008.

7 ANEXOS

ANEXO A – Meios de cultura de soluções utilizadas

Solução Salina de Page:

Cloreto de Sódio (NaCl)	120 mg
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄ . 7 H ₂ O)	4 mg
Hidrogenofosfato dissódico anidro (Na ₂ HPO ₄)	142 mg
Diidrogenofosfato de Potássio (KH ₂ PO ₄)	136 mg
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂ . H ₂ O)	4 mg
Água destilada q.s.p	1000 mL

Preparo: Dissolver os ingredientes em água destilada na ordem apresentada em recipiente apropriado. Distribuir nos volumes requeridos (100mL) em 10 frascos de vidro. Autoclavar (121°C/15min) Incubar o meio durante a noite, a 37°C, para teste de esterilidade. Armazenar o meio à temperatura de 4 - 5°C até três meses.

Ágar não-nutriente (ANN):

Solução Salina de Page 100mL
Ágar 1,5 g

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

Fixador de Shaudinn modificado (Bruckner,1993):

Solução de sulfato de cobre:

20g de sulfato de cobre II 5H₂O
Água destilada q.s.p. 1000 mL

Solução estoque

600 mL de solução de sulfato de cobre II
30 mL de Álcool etílico a 95%
15 mL de Glicerina

Solução fixadora:

100 mL de Solução estoque
5 mL de Ácido acético glacial

Observação: O ácido acético foi adicionado imediatamente antes do uso.

Coloração de tricrômico de Wheatley modificada por Gomori (Bruckner, 1993):

0,6 g de Cromotrope 2R ,
0,3 g de "Light Green" SF
0,7g de ácido fosfotúngstico
1 mL de ácido acético glacial
100 mL de água destilada

Depois de fixadas as lâminas foram tratadas como segue:

- Álcool 70% durante 5 min
- Álcool 70% iodado 1min
- Álcool 70% 5min
- Álcool 70% 3 min
- Tricrômico 13 min
- Álcool 90% acidificado de 1 a 3 segundos
- Álcool 100% para limpar
- Álcool 100% em duas cubas 3 min cada
- Xileno durante 10 min