

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE
ACANTHAMOEBA: DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL PATOGÊNICO NO
DISTRITO FEDERAL**

Aline Silva Moraes^{*}; Rodrigo Gurgel Gonçalves^{**}; Daniella de Sousa Mendes Moreira
Alves^{***}; Paulo Roberto Queiroz^{****}

RESUMO - O gênero *Acanthamoeba* pertence a um grupo de protozoários anfizóicos que podem ou não ser patogênicos. A patogenicidade é determinada por parâmetros morfológicos, físicos, bioquímicos e moleculares. Fatores como osmotolerância e a termotolerância contribuem para a determinação da patogenicidade. A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vem apresentando resultados mais promissores para a identificação do gênero. O objetivo deste trabalho foi isolar amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* em piscinas públicas do DF e espelhos-d'água localizados no Eixo Monumental, Brasília-DF, bem como determinar o potencial patogênico dos isolados. Foi observado crescimento de AVLs em todas as amostras. O gênero *Acanthamoeba* foi encontrado em 20 amostras pela cultura e confirmados pela PCR. Desses, 14 apresentaram algum grau de patogenicidade nos testes de osmotolerância e termotolerância.

Palavras chaves: *Acanthamoeba*. Morfologia. Osmotolerância. Termotolerância. PCR.

**ISOLATION, BIOLOGICAL CHARACTERIZATION AND MOLECULAR OF
ACANTHAMOEBA: DETERMINATION OF THE PATHOGENIC POTENTIAL
IN DISTRITO FEDERAL**

ABSTRACT- The genus *Acanthamoeba* belongs to a group of anifzoic protozoa that may or may not be pathogenic. Pathogenicity is determined by morphological, physical, biochemical, and molecular parameters. Factors such as osmotolerance and thermotolerance contribute to determine pathogenicity. The technique of Polymerase Chain Reaction (PCR) has shown promising results for the identification of the genre. The objective of this study was to isolate *Acanthamoeba* in public pools and water mirrors in public's places of Brasilia-DF, and to determine the pathogenic potential. Free-living amoeba growth was observed in all samples. The genus *Acanthamoeba* was found in 20 samples by culture and confirmed in PCR. Of these, 14 had some degree of pathogenicity in osmotolerance and thermotolerance tests.

Keywords: *Acanthamoeba*. Morphology. PCR. Osmotolerance. Thermotolerance.

^{*}Graduanda do curso de Biomedicina, Centro Universitário de Brasília – UniCEUB, Brasília - DF. E-mail: alinesilvamoraes_df@yahoo.com.br

^{**}Doutor e Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - UnB. Docente do curso de Medicina de saúde e professor adjunto no Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília - UnB, Brasília - DF.

^{***}Mestre em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília – UnB, Brasília - DF

^{****}Doutor em Biologia Animal, Universidade de Brasília - UnB. Docente do curso de Biomedicina, Centro Universitário de Brasília – UniCEUB, Brasília - DF. E-mail: pqsilva@uol.com.br

INTRODUÇÃO

As amebas de vida livre (AVLs) são protozoários anfitriões, ou seja, que não precisam de um hospedeiro para sobreviver. São encontrados nos mais diversos ambientes, tais como lagos, rios, piscinas, esgotos, cursos de água que recebem efluentes industriais, solos, ar, cavos para a extração de areia ou argila, poeira doméstica e de logradouros públicos e hospitalares (PAGE, 1976; SILVA; ROSA, 2003).

As AVLs podem agir como patógenos facultativos causando meningoencefalite, ulcerações de pele e córnea em seres humanos. Os gêneros com potencial patogênico para o homem são: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* e *Sappinia* (VISVESVARA et al., 2007).

A *Naegleria* possui três fases no ciclo biológico tais como trofozoíto, cisto e a forma flagelada. Existem mais de 30 espécies de *Naegleria* descritas com base na sequência do gene rRNA SS. Entretanto somente a *Naegleria fowleri* é a espécie causadora da meningoencefalite amebiana primária, uma doença neurológica caracterizada por lesões necrotizantes e hemorrágicas do sistema nervoso central com evolução clínica rápida e fatal (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2007; TIEWCHAROEN et al., 2009).

O gênero *Acanthamoeba* possui duas fases durante seu ciclo. Quando assume a forma ploriferativa, é denominada de trofozoíto (20 μm – 40 μm). E a forma resistente é chamada de cisto (12 – 30 μm) (ALVES, 2006) (Figura 1)

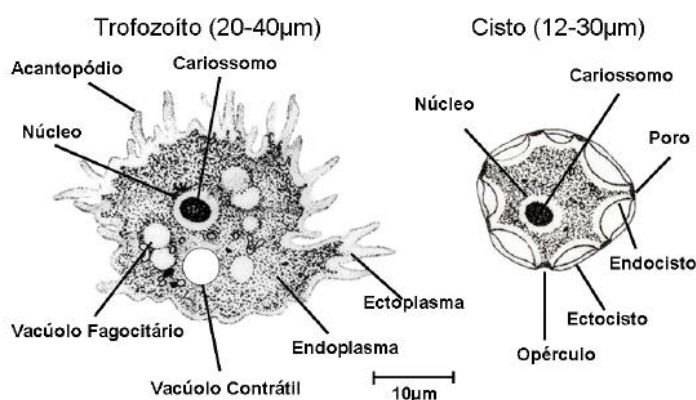


Figura 1 – Fases de desenvolvimento do gênero *Acanthamoeba*. Fonte: Rondanelli e Scaglia (1993).

Os trofozoítos de *Acanthamoeba* apresentam acantopódios em sua superfície, geralmente possuem um núcleo e vacúolos contráteis (KHAN, 2006; PACHECO; MARTINS, 2008). A divisão assexuada ocorre por fissão binária. Em condições adversas os trofozoítos se encistam podendo ficar viáveis durante anos. Os cistos possuem poros conhecidos como ostíolos, que servem para monitorar mudanças ambientais e são resistentes a variações de pH, temperatura e altas radiações gama e Ultra-Violeta (ALVES, 2006).

Pussard e Pons (1977) descreveram mais de 24 espécies de *Acanthamoeba*, baseadas em critérios morfológicos e as classificaram em três grupos segundo suas características morfológicas e o tamanho dos cistos. O grupo I é composto por *Acanthamoeba* spp. com cistos relativamente grandes, endocisto estrelado e ectocisto suavemente esférico. No grupo II o endocisto é poligonalmente estrelado e o ectocisto irregular ou enrugado, enquanto que no grupo III, os cistos apresentam o endocisto arredondado ou ligeiramente angular e o ectocisto ligeiramente enrugado ou liso (KONG, 2009) (Tabela 1).

Tabela 1 – Resumo da classificação morfológica das espécies de *Acanthamoeba* spp. baseada no diâmetro do cisto conforme referido por Pussard e Pons (1977)

Grupo	Diâmetro médio do cisto	Característica do cisto	Espécies e diâmetro médio de cada espécie
Grupo I	≥ 18 µm	Endocisto estrelado e ectocisto suavemente esférico	<i>A. astronyxis</i> (19 µm); <i>A. comandoni</i> (24 µm, 21 µm, 18 µm); <i>A. echinulata</i> (25 µm).
Grupo II	< 18 µm	Endocisto é poligonalmente estrelado e o ectocisto irregular ou enrugado	<i>A. castellanii</i> (14 µm, 15 µm, 16 µm); <i>A. polyphaga</i> (14 µm); <i>A. rhyodes</i> (16 µm); <i>A. griffini</i> (14 µm); <i>A. mauritanensis</i> (14 µm); <i>A. lugdunensis</i> (14 µm); <i>A. divionensis</i> (13 µm); <i>A. paradivionensis</i> (16 µm); <i>A. triangularis</i> (13 µm).

Grupo III	< 19 μm	Endocisto arredondado ou ligeiramente angular e o ectocisto ligeiramente enrugado ou liso	<i>A. palestinensis</i> (18 μm); <i>A. culbertsoni</i> (15 μm , 16 μm , 18 μm); <i>A. lenticulata</i> (13 μm , 11 μm); <i>A. pustulosa</i> (14 μm); <i>A. royreba</i> (15 μm).
-----------	--------------------	---	---

Dentre as infecções causadas por *Acanthamoeba* podem-se destacar a Encefalite Amebiana Granulomatosa que é uma doença de curso clínico prolongado, com um quadro subagudo ou crônico e está geralmente associada a outras doenças debilitantes. Os sintomas mais comuns são hemiparesia, letargia, rigidez de nuca, agitação, afasia, ataxia, náuseas, vômitos, paralisia do nervo craniano e aumento da pressão intracraniana (KHAN, 2008). Alguns pacientes apresentam nódulos na pele poucos dias antes do aparecimento dos sintomas e sinais neurológicos. A porta de entrada pode ser o trato respiratório, úlceras da pele ou qualquer ferida aberta na superfície mucosa ou serosa do corpo, inclusive através de cateteres de diálise peritoneal. A via de invasão e penetração no sistema nervoso central parece ser a hematogênica, a partir do foco primário de entrada da ameba e também através do epitélio neuro-olfativo (CROZETTA, 2007). O período de incubação não é bem conhecido, podendo ser de semanas ou meses (Figura 2).

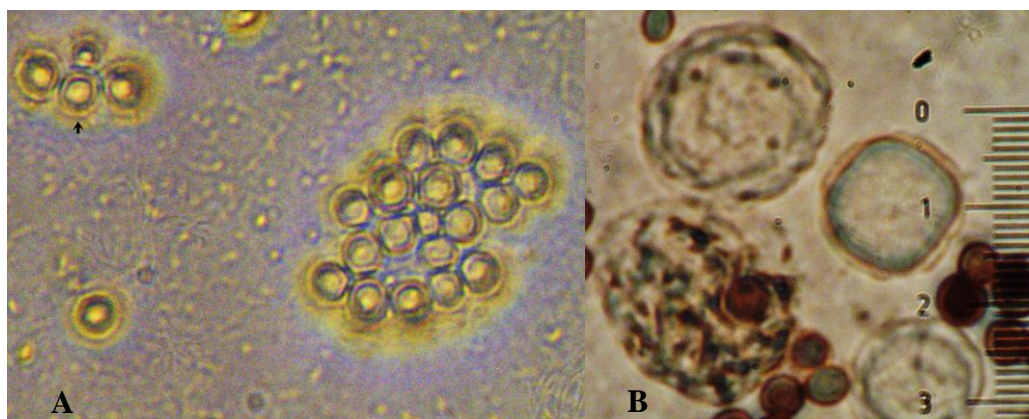


Figura 2 – Cistos de *Acanthamoeba* spp. A: observação de cistos em placa (Microscópio invertido LABOMED TCM 400. Aumento de 400x); B: observação de cistos (~15 μm) (Microscópio óptico Leica DMLB. Aumento de 1000x).

A ceratite por *Acanthamoeba* é uma infecção crônica da córnea, na maioria dos casos unilateral, causada por algumas espécies do gênero *Acanthamoeba* e está normalmente associada ao uso incorreto de lentes de contato (KHAN, 2006; VISVESVARA et al., 2007). As lesões oculares ocorrem, provavelmente, a partir de um microtraumatismo do olho e a contaminação do olho pelas amebas pode ocorrer a partir da água contaminada ou de partículas do ar ou do solo que contenham amebas (LEMUS et al., 2010). Existem casos de ceratite em usuários de lente de contato que fizeram uso de solução salina feita em casa, que nadaram usando lentes e os que não fizeram a desinfecção das lentes no tempo recomendado pelo fabricante. Os principais sintomas são sensação de corpo estranho no olho, lacrimejamento, irritação, inflamação, dor severa, tipicamente desproporcional aos sinais clínicos, edema da pálpebra com pequena secreção, fotofobia e visão alterada com perda gradual (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004b; PENS, 2008). Na avaliação microscópica, podem-se observar infiltrados estromais em epitélio da córnea e raramente esclerite (RUTHES et al., 2004). Em alguns casos pode evoluir para formação de catarata, midríase que é a dilatação da pupila com paralisia do esfíncter iridiano, sinéquia anterior da íris e glaucoma. É bastante comum o aparecimento de infiltrado perineural radial, infiltrado em anel característico e infiltrados subepiteliais (OBEID, 2003).

A acantamebíase cutânea é uma infecção oportunista que acomete principalmente pacientes imunocomprometidos, mas pode também infectar pessoas com o sistema imunológico saudável (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004a). O indivíduo infectado apresenta nódulos eritematosos duros com corrimento purulento podendo evoluir para formas ulcerosas (KHAN, 2006). As lesões são semelhantes a lesões de pele causada por fungos vírus, micobactéria, *Leishmania*, ou câncer de pele. A identificação precoce é importante, pois pode evoluir com comprometimento neurológico (NIYYATI et al., 2009).

Além das doenças causadas por espécies do gênero *Acanthamoeba* o estudo da frequência e da patogenicidade é importante devido ao caráter endossimbiótico dessas amebas. Elas podem ser reservatórios de bactérias patogênicas embora o resultado dessa interação ainda não seja muito bem esclarecido, contudo a sobrevivência e o crescimento intracelular de bactérias em AVLs podem prepará-las para um melhor crescimento em células de mamíferos (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

Dentre as bactérias de importância clínica encontradas no interior de algumas espécies de *Acanthamoeba* encontram-se *Legionella pneumofila*, *Mycobacterium avium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium leprae*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Afipia felis* e espécies dos gêneros *Listeria*, *Rickettsia* e *Chlamidia* (ALSAM et al., 2006; IOVIENO et al., 2010; AKYA; POINTON; THOMAS, 2009; SCHEID; HAURÖDER; MICHEL, 2010). Em 2011, SCHEID e SCHWARZENBERGER realizando um estudo sobre a interação entre AVLs e *Criptosporidium* observaram o desenvolvimento do fungo em amebas dos gêneros *Acanthamoeba*, *Naegleria* e *Vanella*. Esses fatos mostram a relevância epidemiológica da presença de *Acanthamoeba* em ambiente hospitalar como potencial veiculador de disseminação de infecções em humanos (CROZETTA, 2007).

O estudo do potencial patogênico é determinado por parâmetros morfológicos, físicos, bioquímicos e moleculares (KHAN et al., 2001; ALVES, 2006; GIANINAZZI et al., 2009). Fatores como osmotolerância e a termotolerância contribuem para a determinação da patogenicidade. A osmotolerância consiste na inoculação de trofozoítos de *Acanthamoeba* em meio de cultura ágar não nutriente acrescido de manitol em diversas osmolaridades. A alta osmolaridade interfere no crescimento de amebas não patogênicas, mas as patogênicas podem crescer em diversas concentrações do manitol (KHAN et al, 2001). A termotolerância consiste no crescimento dos isolados do gênero *Acanthamoeba* em condições de alta temperatura como parâmetro de patogenicidade.

A *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30461, uma das espécies mais isoladas de casos de encefalite amebiana granulomatosa e ceratites (SILVA; ROSA, 2003). Possui cistos de tamanho médio com diâmetro inferior a 18 µm, o endocisto pode apresentar-se de forma estrelada, oval, triangular ou quadrangular e o ectocisto segue mais ou menos o contorno do endocisto (CROZETTA, 2007). Os isolados desta espécie suportam ambientes completamente secos e podem sobreviver de 2 a 21 anos. Enquanto algumas amebas não resistem a luz solar ou a água do mar, a *Acanthamoeba polyphaga* não demonstra inativação significativa (SRIRAM, 2008).

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vem apresentando resultados mais promissores para a identificação do gênero através da identificação do gene ribossômico de *Acanthamoeba*, devido ao seu tamanho (cerca de 2000 pb no

rDNA) e à grande quantidade de cópias no genoma. Bem como a grande quantidade de dados gerados sobre essas sequências de diversos grupos de organismos facilita a análise comparativa. As técnicas moleculares para identificação de AVL têm sido desenvolvidas para auxiliar o diagnóstico de infecções humanas e também para identificação de AVL em amostras ambientais (SCHROEDER et al., 2001; MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003). A variação é observada na restrição do comprimento do fragmento de polimorfismo nuclear completo ou parcial.

Recentemente, no Distrito Federal - DF, casos de ceratite associado a *Acanthamoeba* tem sido diagnosticados (Dra M. R. C. C. da Universidade de Brasília, comunicação pessoal) indicando a necessidade de estudos sobre amebas de vida livre no DF para melhor avaliação do potencial de risco de transmissão e estratégia de prevenção.

Os objetivos deste trabalho foram isolar amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* em piscinas públicas e espelhos d'água em Brasília – DF, determinar a patogenicidade por meio de testes de osmotolerância e termotolerância e caracterizar morfológica e molecularmente os isolados.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras das piscinas

A partir de um levantamento das piscinas públicas e clubes públicos foram agendadas visitas a cinco locais que contém piscinas de uso público no período de outubro 2010 a fevereiro de 2011. As coletas foram realizadas após o esclarecimento do projeto e assinatura do termo de Autorização para Desenvolver Atividades de Coletas de Dados em Outras Instituições. A assinatura do termo incluiu a participação dos estabelecimentos, com segurança total de sigilo dos dados pertencentes a cada local. Os isolados das piscinas foram denominados de P1 a P9 conforme a ordem das coletas de cada piscina (Tabela 2).

De cada piscina foram coletados cerca de 800 mL da água da superfície em frascos de vidro estéreis e 20 “swabs” foram passados nas bordas próximo à superfície, principalmente em lugares nos quais continham lodo ou havia a formação de biofilmes. Em seguida, os frascos foram fechados e os “swabs” foram acondicionados em tubos

contendo 10 mL de solução de transporte (1:3 solução salina e água destilada estéreis). Tanto os tubos quanto os frascos foram vedados com filme plástico, identificados com a data e local da coleta e transportados a temperatura ambiente para o Laboratório de Parasitologia do Centro Universitário de Brasília (UniCEUB).

Tabela 2 – Locais (L) de amostras de água e de “swabs” de piscinas públicas do Distrito Federal, número de amostras coletadas, tipo de coleta e denominação dos isolados.

Local	Região Administrativa	Amostras Coletadas	Piscinas		Tipo	Isolados
			1	Adulto	água "swab"	P1
L1	Samambaia	6	2	Adulto	água "swab"	P2
			3	Infantil	água "swab"	P3
L2	Brasília	2	4	Adulto	água "swab"	P4
L3	Ceilândia	2	5	Adulto	água "swab"	P5
			6	Adulto	água "swab"	P6
L4	Brasília	2	7	Infantil	água "swab"	P7
			8	Adulto	água "swab"	P8
L5	Brasília	4	9	Adulto	água "swab"	P9

Coleta de amostras de Espelhos d'água

Foram realizadas coletas de 16 amostras em diferentes espelhos d'água localizados no Eixo Monumental, Brasília – DF, no período de outubro 2011 a fevereiro de 2011. Os isolados dos espelhos foram denominados de A1 a A16 conforme a ordem das coletas (Tabela 3).

De cada espelho foram coletados cerca de 200 mL da água da superfície em frascos de vidro estéreis e 20 swabs foram passados nas bordas próximo à superfície, principalmente em lugares onde continha lodo ou havia formado biofilmes. Em seguida,

os frascos foram fechados e os swabs foram acondicionados em tubos contendo 10 mL de solução de transporte (1:3 solução salina e água destilada estéreis). Tanto os tubos quanto os frascos foram vedados com filme plástico, identificados com a data e local da coleta e transportados a temperatura ambiente para o Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB).

Tabela 3 – Amostras de água e swabs de espelhos d'água localizados no Eixo Monumental, Brasília - DF, número de amostras coletadas, tipo de coleta e denominação dos isolados.

Amostras coletadas	Espelhos	Tipo	Isolados
2	1	água "swab"	A1
2	2	água "swab"	A2
2	3	água "swab"	A3
2	4	água "swab"	A4
2	5	água "swab"	A5
2	6	água "swab"	A6
2	7	água "swab"	A7
2	8	água "swab"	A8
2	9	água "swab"	A9
2	10	água "swab"	A10
2	11	água "swab"	A11
2	12	água "swab"	A12
2	13	água "swab"	A13
2	14	água "swab"	A14
2	15	Água	A15

Exame direto

As amostras foram levadas para a câmara de fluxo laminar e transferidas para cálices de sedimentação. Após 24 h uma parte do sedimento dos cálices foi colocada entre lâmina e lamínula para o exame direto (duas lâminas por amostra) no microscópio óptico (*Leica DMLB*), nos aumentos de 100x e 400x.

Semeadura

Na câmara de fluxo laminar foi desprezado o sobrenadante dos cálices e, aproximadamente 14 mL de cada amostra foram transferidos para tubos falcon e centrifugados por 15 min a 2.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e aproximadamente 1 mL do sedimento de cada amostra foi colocado no centro de duas placas de cultura contendo ágar não nutriente 1,5% coberto por uma suspensão de *Escherichia coli* mortas pelo calor (na autoclave) para a alimentação das amebas. Uma das placas foi incubada a 25° C e a outra a 37° C.

As placas foram observadas ao microscópio óptico invertido (LABOMED TCM 400), nos aumentos de 200x e 400x, em intervalos de 24 horas durante 14 dias quanto à presença de amebas de vida livre e suas formas de desenvolvimento.

Teste de flagelação

Com a finalidade de identificar e excluir isolados de *Naegleria fowleri*, foi realizada a técnica de flagelação do organismo. Uma gota do lavado de placa positiva foi colocada sobre lamínula contendo vaselina nas bordas, coberta posteriormente com lâmina e incubada a 37 °C durante 4 horas. A observação foi realizada em intervalos de 2 horas para o aparecimento de formas flageladas.

Caracterização morfológica

Para a caracterização, após o crescimento de amebas de vida livre em culturas, as placas foram lavadas com água destilada estéril, na câmara de fluxo laminar, e as amebas isoladas foram avaliadas morfológicamente de acordo com os aspectos dos

cistos. A análise dos cistos baseou-se na observação da parede conforme os critérios descritos por Page (1986) para a caracterização dos gêneros. O estudo morfológico das AVLs pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* spp. foi realizado através de análises microscópicas usando aumento de 1000x, pelas medidas de cistos com régua micrométrica. Foram medidos de cada amostra 100 cistos para gerar uma média. Conforme o diâmetro dos cistos, entre os isolados de *Acanthamoeba* spp. foram enquadrados nos grupos I, II ou III segundo os critérios sugeridos por Pussard e Pons (1977). A cepa padrão ATCC 30461 (*Acanthamoeba polyphaga*) foi utilizada como controle positivo. A análise estatística do diâmetro dos cistos entre os isolados foi realizada pela variação não paramétrica, Kruskal Wallis.

Indução da forma trofozoítica

Após o isolamento as placas foram lavadas e o lavado foi centrifugado a 2000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante foi desprezado por 3 vezes consecutivas. O sedimento foi inoculado no meio de cultura YAS (0,01 g de extrato de levedura em 100 mL de solução salina de Page) e os inóculos foram incubados à 30° C durante 48 horas para indução da forma trofozoítica e tentativa de purificação (TSVETKOVA et al., 2004).

Após este período, as amostras foram levadas para a câmara de fluxo laminar, homogeneizadas e a diluição foi preparada para a quantificação das fases de desenvolvimento após a inoculação e a verificação da contaminação por fungos e/ou bactérias.

Quando na forma trofozoítica, esses isolados foram submetidos a análise molecular e a testes de osmotolerância e termotolerância.

Osmotolerância

Placas contendo ágar não-nutriente (controle) e ágar não-nutriente contendo manitol nas concentrações de 0,5 M, 1,0 M e 1,5 M foram previamente cobertas com *Escherichia coli* vivas e incubadas a 37 °C durante 24 horas para a formação de colônias.

Mil trofozoítos de cada isolado e da ATCC 30461 foram inoculados nas placas acima descritas. As placas foram incubadas a 30° C durante 120 horas. Em intervalos de

24 horas durante 120 horas foi medido o halo onde houve o crescimento das amebas e o consumo das bactérias. O diâmetro (em milímetros) do inóculo foi medido no momento da inoculação e o da zona clara onde houve crescimento das amebas e o consumo das bactérias na superfície do ágar foi medido em intervalos de 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h. A cepa padrão ATCC 30461 (*Acanthamoeba polyphaga*) foi utilizada como controle positivo. O teste foi realizado em triplicata. Diferenças de crescimento entre os isolados foram testadas usando Kruskal-Wallis.

Termotolerância

Para a termotolerância, placas contendo Ágar não-nutriente foram cobertas com *Escherichia coli* vivas e incubadas a 37° C durante 24 horas para o crescimento das bactérias. Em seguida, cerca de 1000 trofozoítos de cada isolado e da ATCC 30461 foram inoculados em três placas, acima descritas, sendo que uma placa foi incubada a 25° C, a 30° C e a 37° C. Em intervalos de 24 horas durante 120 horas foi medido o halo onde houve o crescimento das amebas e o consumo das bactérias. O diâmetro (em milímetros) do inóculo foi medido no momento da inoculação e o da zona clara onde houve crescimento das amebas e o consumo das bactérias na superfície do ágar foi medido em intervalos de 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h. A cepa padrão ATCC 30461 (*Acanthamoeba polyphaga*) foi utilizada como controle positivo. O teste foi realizado em triplicata. Diferenças de crescimento entre os isolados foram testadas usando Kruskal-Wallis.

Extração de DNA com kit Qiagen

As amostras contendo cerca 10.000 trofozoítos foram centrifugadas a 7.500 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, foram ressuspensas em 180 µL tampão de lise enzimático (ATL) e incubadas a 37° C durante 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram aquecidas no banho-maria a 56° C, nelas foram adicionados 25 µL de proteinase K (600 mAU/mL) e homogeneizados no agitador, em seguida foram adicionados 200 µL de tampão AL (sem etanol), homogeneizou no agitador e incubou a 56° C durante 30 minutos (banho-maria). As amostras foram incubadas a 95° C por 15 minutos para inativar patógenos.

Adicionou-se 200 µL de etanol (96% - 100%) à amostra e homogeneizou-se

novamente. Posteriormente foi pipetado a mistura no DNeasy mini spin column (mini colunas) colocadas sobre tubos de 2 mL, centrifugou a 8.000 rpm durante 1 minuto e descartou-se o conteúdo do tubo. A seguir, colocou-se a mini coluna em um tubo de 2 mL, adicionou-se 500 µL do tampão AW1, centrifugar a 8.000 rpm durante 1 minuto descartando-se o conteúdo do tubo. Adicionou-se 500 µL do AW2 e centrifugar-se a 1.400 rpm durante 3 minutos e descartou-se o conteúdo do tubo. Foi colocada a mini coluna em um tubo novo de 1,5 ou 2 mL, adicionando-se 200 µL do AE diretamente na membrana, incubou a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugou a 8.000 rpm durante 1 minuto (precipitado). Os últimos passos foram repetidos três vezes.

Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada, segundo as descrições de Schroeder et al. (2001), utilizando-se os iniciadores gênero específicos JDP1 (5' GGC CCA GAT CGT TTAC CGT GAA 3') e JDP2 (5' TCT CAC AAG CTG CTA GGG AGT CA 3'). Para a análise do PCR foram preparados 50 µL de solução contendo 1 µL de 0.2 mM dNTPs (Mix, Invitrogen™), 5 µL de tampão de reação (50 mM KCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8,0), Tampão 10X (Invitrogen™), 1,5 µL de 1.5 mM de cloreto de magnésio, 0,2 µL de cada um dos iniciadores JDP1 e JDP2 (100 µM), 1 µL de 20 a 30 ng de DNA, 1 µL de 1 U de Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen,™) e 40,1 µL de água MiliQ.

Essa solução foi colocada no aparelho PTC-150 Minicycler MJ Research thermocycler e programados 30 ciclos. O primeiro foi 94° C durante 5 minutos, seguido por 94° C durante 1 minuto, 58° C durante 1 minuto, 72° C durante 1 minuto, esses três últimos foram repetidos 30 vezes, para terminar a reação, as amostras ficaram ainda no aparelho a 72 °C durante 5 minutos.

Para visualizar o produto amplificado foi colocado 5 µL do DNA em 1% de gel de agarose, com 0,5 µM/mL de brometo de etídio e sob um transiluminador de luz UV, o produto foi visualizado.

RESULTADOS

Foram observadas Amebas de Vida Livre nos 25 lugares pesquisados, sendo que 18 amostras foram provenientes de 9 piscinas públicas ou piscinas de clubes públicos de

recreação do Distrito Federal, localizados em Brasília, Ceilândia e Samambaia, cujos isolados foram denominados de P1 a P9 como descrito anteriormente (Tabela 4).

Tabela 4 – Locais visitados, número amostras coletada, de água de swabs de piscinas públicas do Distrito Federal, número de amostras coletadas, tipo de coleta e denominação dos isolados.

Local	nº de amostra	Tipo	Resultado	Isolados
L1	6	água	-	
		"swab"	+	P1
		água	-	
		"swab"	+	P2
L2	2	água	+	
		"swab"	+	P4
L3	2	água	+	
		"swab"	+	P5
L4	2	água	+	
		"swab"	+	P6
		água	+	
L5	4	"swab"	+	P7
		água	+	
		"swab"	+	P8
		água	+	
		"swab"	+	P9
Total	18	9 água 9 "swab"	15 positivas	9 isolados

(-) Ausência de Amebas de Vida Livre.

(+) Presença de Amebas de Vida Livre.

Trinta e duas amostras foram coletadas de 16 espelhos d'água, pelas quais foi possível isolar amebas de vida livre em todos os espelhos. Os isolados foram denominados de A1 a A16 conforme previamente descrito (Tabela 5).

Tabela 5 – Amostras de água de espelhos d’água localizados no Eixo Monumental, Brasília - DF, número de amostras coletadas, tipo de coleta e denominação dos isolados.

Espelhos	nº de Amostras	Tipo	Resultado	Isolados
1	2	água	+	A1
		"swab"	+	
2	2	água	+	A2
		"swab"	+	
3	2	água	+	A3
		"swab"	+	
4	2	água	+	A4
		"swab"	+	
5	2	água	+	A5
		"swab"	+	
6	2	água	+	A6
		"swab"	+	
7	2	água	+	A7
		"swab"	+	
8	2	água	+	A8
		"swab"	+	
9	2	água	+	A9
		"swab"	+	
10	2	água	+	A10
		"swab"	+	
11	2	água	+	A11
		"swab"	+	
12	2	água	+	A12
		"swab"	+	
13	2	água	+	A13
		"swab"	+	
14	2	água	+	A14
		"swab"	+	
15	2	Água	+	A15
		“swab”	+	
16	2	Água	+	A16
		“swab”	-	
Total	32	16 água 16 “swab”	31 positivas	16 isolados

(+) Presença de Amebas de Vida Livre.

(-) Ausência de Amebas de Vida Livre.

Em 20 locais foram isolados amebas de vida livre com características morfológicas semelhantes a *Acanthamoeba* (Figuras 3 e 4) nos quais foram observados trofozoítos com movimentação lenta, presença de endoplasma e ectoplama (hialino), vacúolos contráteis e finos acantopódios. Também foram encontrados AVLs semelhantes ao gênero *Naegleria* em 5 locais, *Vanella* em 4 locais e ao gênero *Platyamoeba* em 2 locais. Algumas amebas não identificadas foram observadas em 7 amostras (Tabela 6). Além da presença de cistos e trofozoítos de AVLs, ainda nas amostras dos espelhos, foi possível observar AVLs associadas à presença de larvas e/ou ovos de nematelmintos de vida livre. Vale ressaltar que as larvas de nematóide permaneceram vivas durante, pelo menos, 45 dias.

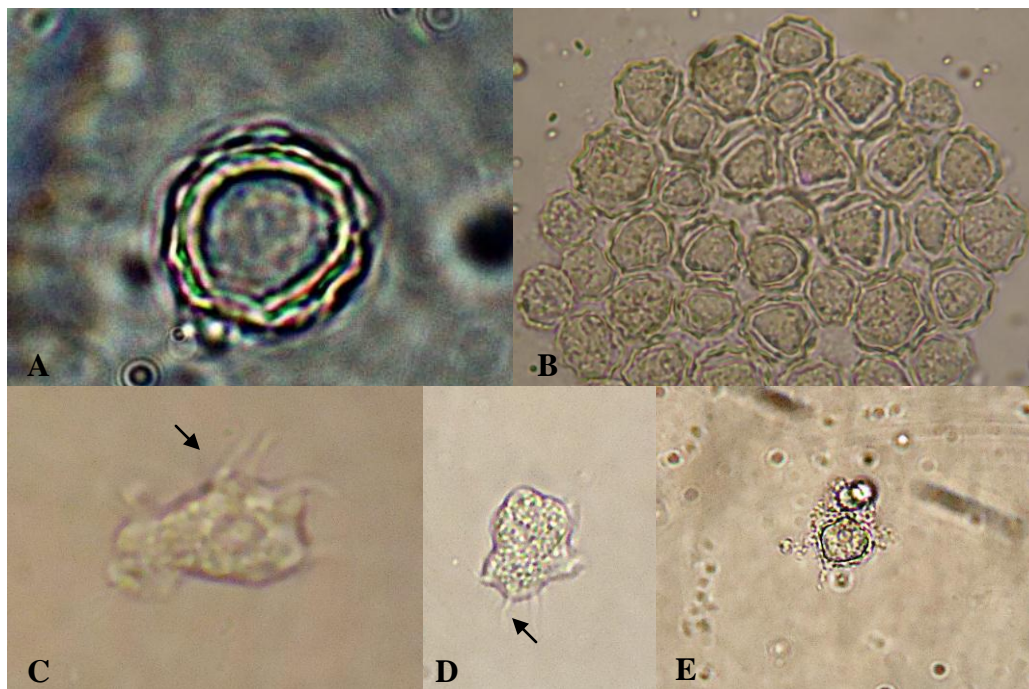


Figura 3 – *Acanthamoeba* spp. **A e B:** Cisto de *Acanthamoeba* - ectocisto e o endocisto visível. (Microscópio óptico Leica DMLB. Aumento de 1000x); **C e D:** Trofozoíto de *Acanthamoeba* sp. Presença de acantopódios (seta) (Microscópio óptico Leica DMLB. Aumento de 1000x). **E:** Cisto de *Acanthamoeba* sp. – núcleo nítido (Microscópio óptico Leica DMLB. Aumento de 1000x).



Figura 4 – **A:** Cisto de *Acanthamoeba* - apresentando ostíolos (poros - seta), endocistos de forma estrelada (estrela) e ectocisto (Microscópio óptico Leica DMLB. Aumento de 1000x); **B:** Cistos (~14µm), Endocisto oval e ectocistos seguindo o contorno do endocisto (Microscópio óptico Leica DMLB. Aumento de 1000x); **C:** Trofozoíto de *Vanella* (Microscópio óptico Leica DMLB. Aumento de 1000x).

Baseado no diâmetro dos cistos e na característica do endocisto 18 os isolados incluindo a cepa padrão são sugestivos de pertencerem ao grupo II (Tabela 6) e 3 se enquadraram no grupo III (A5, A7, A12). A média de cada amostra foi comparada com o controle ATCC. Utilizando a variação não paramétrica (Kruskal-Wallis) para a avaliação dos dados percebeu-se que entre os 20 isolados de *Acanthamoeba* spp. houve variação de tamanho dos cistos (Kruskal-Wallis $H_{21,2.002} = 876,7$; $p < 0,001$) em relação a ATCC 30461. Sendo que os isolados A9, A6 e A5 tiveram o menor tamanho, enquanto os isolados P4, P6, A10 e A15 apresentaram o diâmetro dos cistos similar ao diâmetro da cepa padrão. Também foi possível observar que a diferença de tamanho do cisto se manteve quando comparado aos isolados de diferentes habitats (Kruskal-Wallis $H_{3,2002} = 190,0$; $p < 0,001$). Vale ressaltar que as variantes de habitat aqui avaliadas foram espelhos d'água, piscinas e isolados de ceratite (ATCC 30461). Analisando o diâmetro dos cistos de cada isolado foi observado que a população presente nas amostras possui tamanhos relativamente heterogêneos (Desvio padrão $>2,0$).

Tabela 6 - Caracterização dos gêneros segundo os critérios de Page (1976) e tentativa de agrupamento de *Acanthamoeba* spp de acordo com Pussard e Pons (1977) baseado no diâmetro médio dos cistos e característica do endocisto.

Isolados	Gênero	Característica do endocisto	Diâmetro (µm)	Média (µm)	Desvio Padrão	Grupos sugeridos
P1	ANI ¹		nm ²	-	-	-
P2	<i>Acanthamoeba</i>	E	5 -20	12,03	2,38	II
P3	<i>Acanthamoeba</i>	E	8 -20	12,89	3,04	II
P4	<i>Acanthamoeba</i>	E	9 -20	13,82	2,38	II
P5	ANI		nm	-	-	-
P6	<i>Acanthamoeba</i>	E	10 – 20	14,62	2,33	II
P7	<i>Acanthamoeba</i>	LE	10 – 18	12,67	2,13	II
P8	ANI		8 -18	11,38	1,63	-
	<i>Vanella</i>		nm	-	-	-
P9	<i>Naegleria</i>		nm	-	-	-
	<i>Acanthamoeba</i>	LE	8 -20	11,29	1,99	II
A1	<i>Acanthamoeba</i>	LE	6-17	11,19	2,21	II
A2	<i>Platyamoeba</i>		6-16	11,23	2,14	-
	<i>Acanthamoeba</i>	E	8-13	10,97	1,13	II
A3	<i>Naegleria</i>		nm	-	-	-
	<i>Acanthamoeba</i>	E	10-18	12,68	2,41	II
A4	<i>Vanella</i>		nm	-	-	-
	<i>Platyamoeba</i>		nm	-	-	-
	ANI		nm	-	-	-
A5	<i>Acanthamoeba</i>	A	8 -15	10,58	1,69	III
	<i>Vanella</i>		nm	-	-	-
A6	<i>Acanthamoeba</i>	E	8 -15	11,02	1,71	II
	ANI		nm	-	-	-
A7	<i>Acanthamoeba</i>	A	8 -15	10,92	1,30	III
A8	<i>Acanthamoeba</i>	E	8 -18	11,26	1,71	II
A9	<i>Acanthamoeba</i>	LE	7 – 16	11,06	1,93	II
A10	<i>Acanthamoeba</i>	E	10 -30	16,29	3,48	II
	ANI		8 -18	10,76	1,81	-
A11	<i>Vanella</i>		nm	-	-	-
A12	<i>Acanthamoeba</i>	A	8 -15	11,48	1,52	III
A13	<i>Acanthamoeba</i>	E	7 -17	11,10	1,94	II
	<i>Naegleria</i>		nm	-	-	-
A14	<i>Acanthamoeba.</i>	E	6 -15	11,15	1,90	II
	<i>Naegleria</i>		nm	-	-	-
A15	<i>Acanthamoeba</i>	E	10 -20	14,81	2,29	II
	ANI		nm	-	-	-
	<i>Naegleria</i>		nm	-	-	-
A16	<i>Acanthamoeba</i>	E	8 -21	13,78	2,48	II
ATCC³	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	E	10 - 31	15,68	3,05	II

¹Ameba Não Identificada; ²Cistos que não foram medidos; ³Cepa padrão - ATCC 30461.; (E) Estrelado; (LE) Levemente estrelado; (A) Arredondado.

Teste de flagelação

Tentativas “in vitro” de flagelação foram realizadas apenas nas amostras positivas para o gênero *Naegleria* (P9, A4, A14, A15, A16), contudo não foi possível visualizar, após a indução, a forma flagelada.

Identificação molecular

A partir da amplificação utilizando iniciadores específicos obteve-se um fragmento com tamanho entre 300 – 400 pb em 17 amostras (P2, P3, P4, P6, P7, P9, A1, A3, A4, A6, A7, A8, A10, A12, A13, A15 e A16) e ATCC 30461, três amostras apresentaram fragmentos não específicos (A5, A9 e A14) sugerindo a presença de outras amebas na amostra (Figura 4).

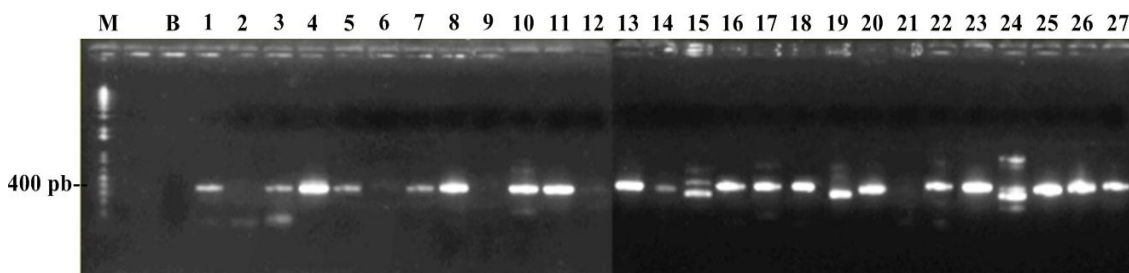


Figura 4 – Análise de PCR de *Acanthamoeba* isolada de água de piscinas e espelhos d’água no Distrito Federal - DF, Brasil. M: Marcador de tamanho molecular (pb); B: controle negativo; 1: cepa padrão *A. polyphaga* ATCC 30461; 2: P1; 3: P2; 4: P3; 5: P4; 6: P5; 7: P6; 8: P7; 9: P8; 10: A1; 11: A2; 12: A3; 13: A4; 14: A4; 15: A5; 16: A6; 17:A7; 18: A8; 19: A9; 20: A10; 21: A11; 22: A12; 23: A13; 24:A14; 25:A15; 26:A16 27; controle positivo .

Osmotolerância

Todos os isolados de *Acanthamoeba* testados cresceram tanto no controle (zero molar) quanto nas concentrações de 0,5 M, 1 M e 1,5 M. Contudo, não foi observada uma diferença significativa do crescimento entre as amostras inoculadas nas diferentes osmolaridades (Kruskal-Wallis $H_{4,252} = 317$; $p = 0,957$). Entretanto, foi possível observar que os isolados P3, A4 e A12 apresentaram crescimento do diâmetro do halo similar ao da ATCC 30461, com a mediana superior ou igual a 20 mm (Kruskal-Wallis $H_{21,64.713} = 252$; $p < 0,001$).

Houve diferença de crescimento entre os isolados inoculados a uma concentração de zero molar (controle) (Kruskal-Wallis $H_{21,63} = 42,595$; $p = 0,002$),

destacando que os isolados A1, A8, P3 e P6, com a mediana de diâmetro do halo superior a 20 mm, um crescimento similar ao da cepa padrão. Também foi possível observar diferença no crescimento entre os 21 isolados inoculados na concentração de 0,5 M incluindo a ATCC 30461. Contudo, somente os isolados A12 e A13 apresentaram uma mediana superior a 20 mm (Kruskal-Wallis $H_{21,63} = 39,205$; $p = 0,006$).

Nas concentrações 1,0 M foi possível observar diferença de crescimento entre os isolados, sendo que os isolados A12, A4, P3, P4 e ATCC 30461 obtiveram um crescimento acima de 20 mm (Kruskal-Wallis $H_{21,63} = 46,864$; $p = 0,001$). Nas concentrações de 1,5 M houve uma maior diferença no diâmetro entre os isolados sendo que os isolados A14, A16, A4, A5, A6, P2, P6 e P7 apresentaram mediana superior a 20 mm do diâmetro (Kruskal-Wallis $H_{21,63} = 49,310$ $p < 0,001$).

Teste de termotolerância

Todos os isolados cresceram a 25° C, 30° C e 37° C. Entretanto, não houve diferença do crescimento dos isolados inoculados nas diferentes temperaturas (Kruskal-Wallis $H_{3,180} = 4,242$ $p = 0,120$). Houve diferença de crescimento do diâmetro do halo entre os 20 isolados (Kruskal-Wallis $H_{21,180} = 68,427$; $p < 0,001$), podendo destacar que os isolados A10 e A13 obtiveram crescimento médio superior a 20 mm.

Foi detectada diferença de crescimento entre os isolados a 25 °C (Kruskal-Wallis $H_{21,60} = 40,127$; $P = 0,003$), a 30 °C (Kruskal-Wallis $H_{21,60} = 37,753$; $p = 0,006$) e entre os isolados que foram inoculados a 37° C (Kruskal-Wallis $H_{21,60} = 44,830$; $p = 0,001$). As diferenças mais evidentes do crescimento do halo após 120 h a 25 °C foram observadas nos isolados A10, A3 e ATCC 30461, às quais obtiveram a mediana acima de 20 mm. A 30 °C os isolados A10, A12 e A4 foram os que mais apresentaram crescimento, enquanto que a ATCC 30461 não obteve o mesmo resultado. A 37 °C, a diferença de crescimento foi mais percebida nos isolados A10, A12, A13 e A5 com a mediana do diâmetro dos halos acima de 20 mm.

Foram considerados isolados possivelmente patogênicos os que apresentaram um crescimento médio do halo superior a 20 mm de diâmetros. Sendo que os osmotolerantes são aqueles que cresceram nas concentrações 1 M e 1,5 M, e os

termotolerantes os que cresceram na temperatura de 37° C. Portanto, dos 20 isolados, 14 incluindo a ATCC 30461 possuem algum grau de patogenicidade (Tabela 7).

TABELA 7 - Comparação das médias do crescimento do halo em mm nos testes de Osmotolerância e Termotolerância e indicação dos Isolados Potencialmente Patogênicos (IPP).

Isolados	OSMOTOLERÂNCIA		TERMOTOLERÂNCIA	IPP
	1,0 M	1,5 M	37° C	
P2	-	+	+	α β
P3	+	+	-	α
P4	+	-	-	α
P6	-	+	+	α β
P7	-	+	+	α β
P9	-	-	+	β
A1	-	-	-	
A3	-	-	-	
A4	+	+	-	α
A5	-	+	+	α β
A6	-	-	-	
A7	-	-	-	
A8	-	-	+	β
A9	-	-	-	
A10	-	-	+	β
A12	+	-	+	α β
A13	-	-	+	β
A14	-	+	-	α
A15	-	-	-	
A16	-	+	-	α
ATCC¹	+	-	+	α β

(+) crescimento do halo maior que 20 mm; (-) crescimento do halo menor que 20 mm
 (α) Isolados osmotolerante; (β) Isolados Termotolerante; ¹ATCC 30461: cepa padrão.

DISCUSSÃO

Foram encontradas Amebas de vida livre (AVLs) de quatro gêneros, mas somente foi considerado o gênero *Acanthamoeba* spp.. O isolamento de outros gêneros como *Naegleria*, *Vanella*, *Platyamoeba* e outras amebas não identificadas tem grande importância para a determinação de medidas profiláticas. Além do mais a *Naegleria fowleri*, agente causador da meningoencefalite amebiana primária, e a *Vanella* podem ser veiculadoras de microrganismos patogênicos (SCHEID, 2007; SCHEID;

SCHWARZENBERGER, 2011). A presença de AVLS em amostras ambientais é muito freqüente, principalmente porque esses protozoários estão amplamente distribuídos no ambiente e seus cistos podem ser transportados pelo ar, pela água de abastecimento ou, até mesmo, por banhistas, no caso de contaminação de piscinas (MUÑOZ et al., 2003).

A freqüência de AVLS tem despertado interesse de pesquisadores para desenvolverem estudos em sistemas de água, rios, piscinas solo e atmosfera a fim de determinar a ocorrência de AVL em ambientes relacionados a habitats humanos (CAUMO, 2009).

A grande positividade de *Acanthamoeba* encontrada neste estudo corrobora com dados relatados por diversos autores, especialmente por ser um protozoário pouco exigente e sua prevalência ocorre em função de seus cistos possuírem a capacidade de resistir a variações climáticas e a mecanismos de desinfecção (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004b; KHAN, 2008). Leiva et al. (2008) relataram a positividade de 125 (45%) em um total de 294 amostras coletadas de diferentes fontes de água, sendo que dessas 39 (31,2%) foram classificadas dentro dos critérios morfológicos como *Acanthamoeba* e 24 (19,2%) foram classificadas como *Naegleria*. Caumo (2009) observou amebas do gênero *Acanthamoeba* de amostras de piscinas da Cidade de Porto Alegre em 20% das 63 amostras.

Em 2006, Alves pesquisou a presença de AVLS em 15 amostras de solo e mostrando 14 (93%) foram positivas para AVLS, sendo que o gênero *Acanthamoeba* (100%) apareceu em todas as amostras positivas, seguido do gênero *Naegleria* (42%) e *Vanella* (14%). Adicionalmente, a mesma autora coletou 33 amostras de piscinas de clubes localizados em Brasília – DF e, dessas amostras, foram selecionados 6 isolados em que foi possível observar em 5 (83,3%) dos isolados AVLS pertencentes ao gênero *Naegleria*, em 1 (16,6%) isolado amebas do gênero *Acanthamoeba* e 1 (16,6%) dos isolados amebas do gênero *Vanella*.

Não obstante, Carlesso et al. (2007) encontraram positividade em 47 (35%) das 135 amostras sendo que dessas, 36 (76,6%) foram amostras de biofilme provenientes de bebedouros, reservatórios de água e de torneiras de um hospital público da cidade de Porto Alegre, RS. Os autores isolaram cepas sugestivas de pertencerem ao gênero *Acanthamoeba* em 16 (34%) das 47 amostras positivas para AVLS.

Em outro estudo, Kilic et al. (2004) encontraram AVLs do gênero *Acanthamoeba* em 100% das amostras de solo e de água. Mais recentemente, Chan et al. (2011) analisaram 87 amostras de ar condicionado, detectando 20 positivas para *Acanthamoeba*, dentre as quais foram identificadas 5 espécie desse gênero.

Houve grande contaminação por fungos e bactérias na maioria das amostras. Isso foi esperado, tendo em vista que são amostras ambientais. Entretanto, a contaminação não prejudicou a visualização das formas evolutivas. E, por conta da contaminação, foram realizados repiques sucessivos em meio líquido, na tentativa de obter amostras axenizadas para testes futuros, contudo a purificação dessas amostras, até o momento, não foi possível. É freqüente na literatura relatos da dificuldade em axenizar isolados de AVL, principalmente nas amostras ambientais, pois a maior dificuldade de se obter isolados purificados é estimular o crescimento das amebas e, concomitantemente, inibir o crescimento de outros microrganismos (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004b; TSVETKOVA et al., 2004).

Quanto à classificação morfológica, baseados no tamanho e na morfologia dos cistos, Pussard e Pons (1977) dividiram 18 espécies de *Acanthamoeba* em grupos I, II e III; dessas espécies, 15 foram classificados como patogênicas. Neste trabalho dos 25 isolados, 20 foram caracterizados como do gênero *Acanthamoeba*. Assim, baseados em Pussard e Pons (1977), os cistos foram medidos em exames diretos, em que os resultados sugeriram que os cistos encontrados pertenciam aos grupos II e III. As espécies pertencentes a esses grupos são morfológicamente muito próximos e estão entre os isolados mais frequentes de infecção humana, principalmente meningoencefalites e ceratites (CAUMO, 2009). A heterogeneidade do diâmetro dos cistos de cada isolado pode ocorrer uma vez que a morfologia dos cistos depende da condição da cultura e é altamente variável dentro de uma mesma cepa (ALVES, 2006). Por isso a importância de se fazer a caracterização morfológica associada a identificação molecular (KONG, 2009).

Então, para a confirmação dos gêneros, os 25 isolados e a ATCC 30461 foram submetidos às técnicas de extração de DNA e PCR. Vinte dos isolados do gênero *Acanthamoeba* foram confirmados pela técnica de PCR.

A PCR é sensível e específica para a detecção de AVL e é usada para o diagnóstico confirmatório de infecção e diagnóstico ambiental. A fim de complementar

os testes convencionais para diferenciação de AVL, o diagnóstico por PCR utilizando oligonucleotídeos gênero-específico de sequências 18S do rDNA tem sido realizados por diversos autores na identificação de *Acanthamoeba* de várias fontes ambientais (CAUMO, 2009).

O gênero *Acanthamoeba* possui espécies patogênicas e não patogênicas, recentemente divididas em 17 genótipos diferentes (T1 a T17) que foram classificados com a análise de sequência de rDNA baseada em avanços tecnológicos da biologia molecular (MAGLIANO; TEIXEIRA; ALFIERI, 2011). Os isolados de *Acanthamoeba* provenientes de pacientes com ceratite foram classificados nos subtipos T3, T4, T6 e T11, sendo que mais de 95% deles pertencem ao genótipo T4, sugerindo que o potencial patogênico esteja diretamente ligado às características genóticas (KHAN et al, 2002).

Schroeder et al. (2001) obtiveram especificidade ao utilizarem os iniciadores JDP1 e JDP2 para a confirmação e diferenciação do gênero *Acanthamoeba* em comparação com outros gêneros de amebas. Eles amplificaram e sequenciaram de 18SrDNAs dos genótipos T1 a T12.

Em 2011, Caumo e Rott identificaram genótipo de *Acanthamoeba* usando o sequenciamento 18SrDNA de 13 isolados obtidos de piscinas de águas de clubes sociais em Porto Alegre. A amplificação gênero-específica com os iniciadores JDP1 e JDP2 foi bem sucedida em todos os isolados testados cujos resultados revelaram que os isolados de *Acanthamoeba* pertenciam aos genótipos T3, T4 e T5. Também Hsu et al. (2009) identificaram *Acanthamoeba* pela técnica de PCR utilizando os iniciadores JDP1 e JDP2 em 9 de 55 amostras de áreas termais de recreação em Taiwan. E, no Irã, 14 de 19 isolados provenientes de amostras de água caracterizados morfológicamente como *Acanthamoeba* foram confirmados pela técnica da PCR (MAHMOUDI et al, 2011).

Os isolados de *Acanthamoeba* foram submetidos a testes físicos de osmotolerância e termotolerância para a avaliação do potencial patogênico em que se observou o crescimento de halo em 100% dos isolados testados nos dois testes, contudo foi observado crescimento significativo (acima de 20 mm) em alta osmolaridade de 11 isolados, e no teste de termolerância de 10 isolados foi observado crescimento considerando médias superiores a 20 mm. Segundo Khan et al (2001) *Acanthamoeba* patogênicas são capazes de crescer em alta pressão osmótica, sendo o manitol um inibidor de amebas não patogênicas. Em todos os meios de manitol, trofozoítos foram

observados nos isolados, indicando que o meio não inibiu seu crescimento. Mas em alguns isolados nas concentrações de 1 M e 1,5 M houve predominância de cistos, indicando a diminuição do crescimento. No Brasil Carlesso et al. (2010) observaram crescimento em 4 dos 10 isolados em alta osmolaridade e no teste de termotolerância obtiveram 100% de crescimento de suas amostras a 37 °C. Os autores consideraram patogênicos os isolados que formaram halo igual ou superior a 20 mm na temperatura de 40° C e na concentração de 1 M de manitol.

Na Turquia, Kilic et al. (2004) detectaram crescimento em 12 dos 18 isolados tanto em alta osmolaridade quanto nos isolados inoculados a 37 °C.

Khan et al. (2001) observaram crescimento de todos os isolados inoculados em baixa osmolaridade, contudo quando incubados em alta osmolaridade, apenas isolados de *Acanthamoeba* patogênica cresceram exceto a *A. griffini* que mostrou crescimento lento. Os autores também observaram crescimento de todos os isolados incubados em baixa temperatura, entretanto quando incubados em alta temperatura apenas isolados patogênicos cresceram.

Em 2011, WINCK; CAUMO e ROTT obtiveram 13 isolados do gênero *Acanthamoeba* de 136 amostras torneira no Rio Grande do Sul. Os 13 isolados foram confirmados por PCR utilizando o iniciador gênero-específico da região 18S rDNA, obtendo espécies dos genótipos T2, T4 e T6. Todos os isolados cresceram a 37° C e a 0,5 M, contudo apenas 4 isolados formaram o halo maior que 20 mm a 1 M.

A variação de crescimento de um isolado em altas temperaturas e, também, em alta osmolaridade, pode ser relacionada à virulência, uma vez que, um isolado com potencial patogênico pode ser considerado mais ou menos virulento dependendo de sua capacidade de adaptação e a viabilidade dos tecidos do hospedeiro (CALERSSO et al., 2010).

CONCLUSÕES

Utilizando-se as técnicas tradicionais que são aplicadas aos protozoários foi possível o isolamento primário e o cultivo de *Acanthamoeba* a partir de amostras de piscinas e espelhos d'água de locais públicos no Distrito Federal.

Foram isolados protozoários tanto de espelhos d'água quanto isolados de piscina.

Os isolados apresentaram crescimento em alta temperatura e osmolaridade e, apesar de algumas cepas desenvolverem crescimento lento e um pouco limitado, pode-se considerá-las potencialmente patogênicas.

Com a técnica de PCR foi possível a confirmação dos isolados positivos para o gênero *Acanthamoeba* mostrando-se uma técnica importante para a identificação de AVLs. O estudo genético desses protozoários é necessário, uma vez que, o potencial patogênico está relacionado com a característica genotípica das espécies.

A presença desses microrganismos nos ambientes estudados configura risco à saúde da população e, conseqüentemente, um problema de saúde pública, uma vez que, esses protozoários possuem algum grau de patogenicidade.

Futuros estudos baseados em infecções experimentais em modelos animais e o sequenciamento dos isolados de *Acanthamoeba* serão necessários para a continuação da avaliação do potencial patogênico.

O maior conhecimento sobre os isolados do gênero *Acanthamoeba* no Distrito Federal poderá contribuir para a elaboração de medidas de profilaxia junto à população.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Laboratório de Parasitologia e Biologia de Vetores da Universidade de Brasília pelo auxílio e suporte à pesquisa, à professora Dr. Nadjar Nitz Lociks, ao biomédico Adriano Rios da Silva e ao Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, pelo auxílio na parte molecular deste trabalho.

REFERÊNCIAS

ALSAM, S.; JEONG, S. R.; SISSONS, J.; DUDLEY, R.; KIM, K. S.; KHAN, N. A. *Escherichia coli* interactions with *Acanthamoeba*: a symbiosis with environmental and clinical implications. *Journal of Medical Microbiology*, v. 55, p. 689–694, 2006.

ALVES, D. S. M. M. Isolamento e caracterização morfológica de Amebas de Vida Livre em amostra de solo e água de piscina no Distrito Federal. Brasília, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade de Brasília.

AKYA, A.; POINTON, A.; THOMAS, C. Viability of *Listeria monocytogenes* in co-culture with *Acanthamoeba* spp. *Microbiology Ecology*, v. 70, p. 20–29, 2009.

CARLESSO, A. M.; SIMONETTI, A. B.; ARTUSO, G. L.; ROTT, M.B. Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes de um hospital público da Cidade de Porto Alegre, RS. *Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, v. 40, n. 3, p. 316-20, 2007.

CARLESSO, A.M.; ARTUSO, G.L.; CAUMO, K.; ROTT, M.B.. Potentially Pathogenic *Acanthamoeba* Isolated from a Hospital in Brazil. *Current Microbiology*, v. 60, p. 185–190, 2010.

CAUMO, K. . Caracterização de isolados de *Acanthamoeba* em águas de piscinas da cidade de Porto Alegre, RS. Porto Alegre, 2009. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Faculdade de Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

CAUMO, K.; ROTT, M. B. *Acanthamoeba* T3, T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern, Brazil. *Acta Tropica*, v. 117, n.36, p. 233 – 235, 2011.

CHAN L.L.; MAK J.W.; LOW Y.T.; KOH T.T.; ITHOI I.; MOHAMED S.M. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* spp. from air-conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. *Acta Tropica*, v. 17, p. 23-30, 2011.

CROZETTA, M. A. S. Identificação morfológica e molecular de Amebas de Vida Livre do gênero *Acanthamoeba* isoladas em poeira de ambiente hospitalar. Curitiba, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Departamento de Patologia Básica e Patologia médica - Universidade Federal do Paraná.

GIANINAZZI, C.; SCHILD, M.; WÜTHRICH, F.; MÜLLER, N.; SCHÜRCH, N.; GOTTSTEIN, B. Potentially human pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a heated

indoor swimming pool in Switzerland. *Experimental Parasitology*, v. 121, p. 180–186, 2009.

IOVIENO, A.; LEDEE, D. R.; MILLER, D.; ALFONSO, E. C.. Detection Of Bacterial Endosymbionts In Clinical *Acanthamoeba* Isolates. *Ophthalmology*. Author manuscript, v. 117, n. 3, p. 445–452.e3, 2010.

KHAN, N. A. Pathogenicity, Morphology, and Differentiation of *Acanthamoeba*. *Current Microbiology*, v. 43, p. 391-395, 2001.

KHAN, N. A.; JARROL, E. L.; PAGE, T. T. A.. Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. *Current Microbiology*. v. 45, p. 197-202, 2002

KHAN, N.A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 30, p. 564–595, 2006.

KHAN, N.A. *Acanthamoeba* and the blood-brain barrier: the breakthrough. *Journal Medical Microbiology*, v. 57, p. 1051-1057, 2008

KILIC, A.; TANYUKSEL, M.; SISSONS, J.; JAYASEKERA, S.; KHAN, N. Isolation of *Acanthamoeba* isolates belonging to T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental samples in Ankara, Turkey. *Acta Parasitologica*, v. 49, p. 246-252, 2004.

LEIVA, B.; CLASDOTTER, E.; LINDER, E.; WINIECKA-KRUSNELL, J. Free-living *Acanthamoeba* and *Naegleria* spp. Amebae in water sources of León, Nicaragua. *Revista de Biología Tropical*, v. 56, p. 439-446, 2008.

LEMUS, P. B.; BAUTISTA, G. A. R.; MUÑOZ, C. Z.; MONTES, M. R. I.; FLORES, E. R., MARTÍNEZ, M. D. H. *Acanthamoeba* spp. in domestic tap water in houses of contact lens wearers in the metropolitan area of Mexico City. *Experimental Parasitology*, v. 126, p. 54–58, 2010.

MAGLIANO, A. C. M.; TEIXEIRA, M. G.; ALFIERI, S. C. Revisiting the *Acanthamoeba* species that form star-shaped cysts (genotypes T7, T8, T9, and T17): characterization of seven new Brazilian environmental isolates and phylogenetic inferences, DOI: 10.1017/S011001648, p. 1-8, 2011

MAHMOUDI, M. R.; TAGHIPOUR, N.; EFTEKHAR, M.; HAGHIGHI, A.; KARANI, P. Isolation of *Acanthamoeba* species in surface waters of Gilan province-north of Iran. *Parasitology Research*, DOI 10.1007 s00436-011-2530-1, 2011.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. Acanthamoeba spp. as Agents of Disease in Humans. *Clinical Microbiologist Reviews* v. 16, n. 2, p. 273-307, 2003.

MUÑOZ, V.; REYES, H., TOCHE, P.; CÁRMAMO, C.; GOTTLIEB, B. Aislamiento de amebas de vida libre en piscinas públicas de Santiago de Chile. *Parasitol Latinoamerica*, v. 58 n. 3-4, p. 106-111, 2003.

NIYYATI, M. et al. Comparison of a PCR-Based Method with Culture and Direct Examination for Diagnosis of Acanthamoeba keratitis. *Iranian Journal of Parasitology*, v. 4, n.2, p.38-43, 2009.

OBEID, W.N.; ARAÚJO, R.; VIEIRA, L.A.; MACHADO, M. A. C.; Ceratite bilateral por Acanthamoeba – Relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, v. 66, p. 876-80, 2003

PACHECO, L. G.; MARTINS, A. V. Importância do Estudo das Amebas de Vida Livre. *Revista Saúde & Ambiente*, v. 3, n. 1, p. 57-65, 2008.

PAGE, F. C. Illustrated Key to Freshwater and Soil Amoebae. *Freshwater Biological Association, Ambleside*. 1976.

PENS, C. P. Estudo da frequência de Acanthamoeba e bactérias em biofilmes e líquidos de conservação de estojos de lentes de contato. Porto Alegre, 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

PUSSARD, M.; PONS, R. Morphologie de La paroi kystique et taxonomie Du genre Acanthamoeba (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*, v. 8, p. 557-98, 1977.

RUTHES, A. C. C.; WAHAB, S.; WAHAB, N.; MOREIRA, H.; MOREIRA, L.. Conjuntivite presumível por Acanthamoeba. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*, v. 67, n. 6, p. 897-900, 2004

SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S.. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal parasitology*, v. 34, p. 1001- 27, 2004a.

SCHUSTER, F. L. E VISVESVARA G. S. Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resistance Updates*, v. 7, p. 41–51, 2004b.

SCHEID, P. Mechanism of intrusion of a microsporidian-like organism into the nucleus of host amoebae (*Vannella* sp.) isolated from a keratitis patient. *Parasitology Research*, v. 101, p. 1097–1102, 2007.

SCHEID, P.; HAURÖDER, B.; MICHEL, R. Investigations of an extraordinary endocytobiont *Acanthamoeba* sp.: development and replication. *Parasitology Research*, v. 106, p. 1371–1377, 2010.

SCHEID, P. L.; SCHWARZENBERGER, R. Free-living amoebae as vectors of cryptosporidia. *Parasitology Research*, v. 109, p. 499–504, 2011.

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

SCHROEDER, J. M. et al. Use of Subgenetic 18S Ribosomal DNA PCR and Sequencing for Genus and Genotype Identification of *Acanthamoebae* from Humans with Keratitis and from Sewage Sludge. *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 5, p. 1903–1911, 2001.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; ODDÓ, B. D.; VIANA, L. E. O.; PINTO, R. C. T.; BRAGA, B. D.; RÔÇAS, G.; GELLER, M.; ANTONIO V. E. Neuroinfecção por *Naegleria fowleri*: aspectos clínico-terapêuticos, epidemiológicos e ecológicos. *Revista de Neurociências*, v. 15, n. 4, p. 310-316, 2007.

SRIRAM R., SHOFF M., BOOTON G., FUERST P., AND VISVESVARA G. S.,. Survival of *Acanthamoeba* cysts after desiccation for more than 20 years. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, p. 4045–4048, 2008.

TIEWCHAROEN, S.; RABABLERT, J. e JUNNU, V. In vitro Susceptibility of *Naegleria fowleri* trophozoites to amphotericin b-combined chlorpromazine. *Research. Journal Microbiology*, v. 4, p. 320-333, 2009.

TSVETKOVA, N. et al. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitology*, v. 92, p. 405–413, 2004.

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

WINCK, M. A. T.; CAUMO, K.; ROTT, M. B. Prevalence of *Acanthamoeba* from Tap Water in Rio Grande do Sul, Brazil. *Current Microbiology*, v. 63, p. 464–469, 2011.