

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

Cynara Oliveira Possamai

Classificação morfológica, genotipagem e avaliação da
patogenicidade de isolados clínicos e ambientais de
Acanthamoeba em Vitória e região metropolitana (ES)

Vitória, ES
2012

CYNARA OLIVEIRA POSSAMAI

Classificação morfológica, genotipagem e avaliação da
patogenicidade de isolados clínicos e ambientais de
Acanthamoeba em Vitória e região metropolitana (ES)

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da
Universidade Federal do Espírito Santo,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Doenças Infecciosas.
Área de concentração: Parasitologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cinthia Furst Leroy
Gomes Bueloni
Co-orientador: Prof. Dr. Fausto Edmundo
Lima Pereira

Vitória, ES
2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

- P856c Possamai, Cynara Oliveira, 1985-
Classificação morfológica, genotipagem e avaliação da patogenicidade de isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba* em Vitória e região metropolitana (ES) / Cynara Oliveira Possamai. – 2012.
121 f. : il.
- Orientadora: Cinthia Furst Leroy Gomes Bueloni.
Coorientador: Fausto Edmundo Lima Pereira.
Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.
1. Acanthamoeba. 2. Protozoário patogênico. 3. Ceratite. 4. Interação genótipo-ambiente. I. Bueloni, Cinthia Furst Leroy Gomes. II. Pereira, Fausto Edmundo Lima. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

CYNARA OLIVEIRA POSSAMAI

Classificação morfológica, genotipagem e avaliação da patogenicidade de isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba* em Vitória e região metropolitana (ES)

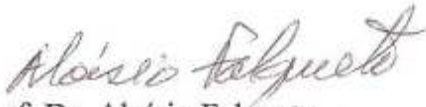
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas. Área de concentração: Parasitologia.

Aprovada em: 28 de agosto de 2012. Vitória, ES.

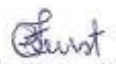
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dra. Adriana Oliveira Costa

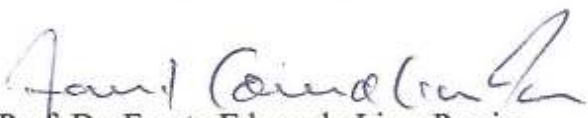
Universidade Federal de Minas Gerais
Membro Externo


Prof. Dr. Aloísio Falqueto

Universidade Federal do Espírito Santo
Membro Interno


Prof. Dra. Cinthia Furst Leroy Gomes Bueloni

Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora


Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira

Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientador

A Deus, pela proteção.

“Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei”
(Salmos 91:2)

“Porque aos seus anjos dará ordem ao teu respeito, para te guardarem em todos os teus caminhos. Eles te sustentarão nas suas mãos, para que não tropeces com o teu pé em pedra”
(Salmos 91:11.12)

“Porquanto tão encarecidamente me amou, também eu o livrarei; pô-lo-ei em retiro alto, porque conheceu o meu nome”
(Salmos 91:14)

Ao meu amor, Fabricio Carletti, pelo companheirismo, apoio e dedicação. Sem você nada disso teria sido possível.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Elimario e Rita, aos quais dedico todas as conquistas da minha vida com a mais profunda admiração e respeito. A vocês, que com amor, sacrifício e trabalho sempre se doaram inteiros, não tenho palavras que traduzam minha eterna gratidão. Amo muito vocês.

Aos meus irmãos: Diego, Cris e Wander. Companheiros da vida que, com amizade, carinho, apoio e incentivo, me motivaram a seguir em frente. Vocês são maravilhosos e eu os amo muito.

À minha orientadora, Dr^a. Cinthia Furst Leroy Gomes Bueloni, por ter confiado a mim este projeto tão importante e pelas oportunidades de aprendizado oferecidas. Certamente, o seu incentivo, enorme paciência, sua amizade e compreensão foram fundamentais e fizeram toda diferença durante a realização deste trabalho, principalmente nos momentos difíceis. Sua ética e competência como parasitologista me inspiram desde a graduação e contribuíram enormemente para o meu amadurecimento profissional.

À Dr^a. Adriana Oliveira Costa, por toda disponibilidade, paciência e atenção ao me receber em seu laboratório, pelos valiosos ensinamentos e empenho no aprimoramento desta dissertação. Sem a sua colaboração não teria sido possível concretizar este trabalho.

À Dr^a. Débora do Rocio Klisiowicz, que colaborou com seus conhecimentos de forma inestimável, sem os quais eu não poderia ter finalizado este projeto.

Ao Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, pela orientação.

À equipe médica do Setor de Oftalmologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes: Dr. Abraão, Dr. Angelo, Dr^a. Diusete, Dr^a. Miquele e Dr^a. Fernanda. Agradeço pela parceria, confiança, ajuda e atenção ao longo desses dois anos.

À amiga e companheira de laboratório, Thaynnara Letícia Alves de Lima, pela incansável ajuda e dedicação. Sua companhia, contribuição e disponibilidade em todas as etapas deste trabalho foram imprescindíveis para a realização do mesmo. Sem você tudo teria sido mais difícil e demorado. Muito obrigada.

A todos os demais colegas presentes e aos que passaram pelo Laboratório de Parasitologia, pela agradável convivência e ajuda prestada na realização deste projeto. Agradeço principalmente aos amigos: Maria Augusta, Ana Paula, Steveen, Juliana e Elisa, que com alegria, companheirismo, apoio, carinho e amizade tornaram os meus dias de trabalho muito mais produtivos, divertidos e inesquecíveis.

A todos os professores e funcionários do Laboratório de Parasitologia e do NEMES, em especial aos amigos Claudiney e Adelson, que colaboraram da melhor forma possível nos momentos que precisei de ajuda. Agradeço também pela amizade, pelos conselhos, incentivo e por tornar o laboratório um lugar a ser lembrado com carinho e saudades.

Ao Laboratório de Histologia Molecular e Imunoistoquímica (LHMI), ao Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade (NGACB) e ao Laboratório de Gastroenterite Infecciosa (LabGI), por disponibilizarem, sempre que necessário, os equipamentos que tanto precisei e foram essenciais para a realização deste estudo. Um agradecimento especial ao amigo Cristie, a Juliana e a Laura, pelo valioso auxílio prestado nos respectivos laboratórios.

Às amigas do “Quinteto”, Raquel, Flávia, Jéssica e Aline, por fazerem parte da minha vida desde a graduação e por estarem presentes em todos os momentos, torcendo sempre por mim. Com vocês eu divido, sem dúvida alguma, uma amizade eterna e as minhas melhores histórias. Amo vocês demais.

A todas as amigas cachoeirenses de infância e adolescência, em especial as mais presentes: Carol, Camila, Nayara, Janine e Natália, pelo enorme carinho e amizade, por compreenderem minha ausência em muitos momentos ao longo desses dois anos e por me ajudarem de todas as formas possíveis, sempre. Sinto muito a falta de todas vocês.

A Giovanna, ou Gigi, pela amizade e por me motivar sempre com palavras de apoio e sabedoria. Agradeço enormemente por toda ajuda e pelas oportunidades profissionais proporcionadas nos momentos mais difíceis desde a minha preparação para o mestrado. Muito obrigada.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Aloísio Falqueto e Dr^a. Adriana Oliveira Costa, por aceitarem avaliar meu trabalho, dando-me a enorme satisfação de ter

os seus conhecimentos e sugestões para o aperfeiçoamento do mesmo. E aos suplentes: Dr. Angelo Ferreira Passos e Dr^a Blima Fux.

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, pela oportunidade e pelo auxílio financeiro para a participação em congressos e para a realização de estágios em outras universidades.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida, e à FAPES, por ter financiado a maior parte deste projeto.

E, por fim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho.



RESUMO

O gênero *Acanthamoeba* compreende protozoários anfizóicos que estão presentes nos mais diversos ambientes, podendo causar no homem doenças graves, como a ceratite amebiana e a encefalite amebiana granulomatosa. Os fatores envolvidos na patogenicidade de *Acanthamoeba* não são inteiramente conhecidos, por isso, alguns marcadores vêm sendo investigados na tentativa de identificar linhagens capazes de causar infecção. O objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de *Acanthamoeba* em amostras clínicas e ambientais, bem como caracterizar os isolados obtidos por parâmetros morfológicos, genotipagem e avaliação do potencial patogênico. Foram coletadas amostras de raspado de córnea de pacientes com suspeita de ceratite amebiana e amostras ambientais provenientes de poeira, solo, piscina, água potável, água de inundação e água do mar da região metropolitana de Vitória-ES. Todas as amostras foram cultivadas em meio ágar soja. Além da cultura, as amostras de raspado de córnea também foram coletadas em salina de Page e submetidas a uma reação de semi-nested PCR. Culturas positivas para *Acanthamoeba*, identificadas com base na morfologia dos cistos e trofozoítos, foram selecionadas, clonadas e classificadas nos grupos morfológicos I, II ou III. A genotipagem dos isolados foi realizada a partir do sequenciamento parcial do gene 18S rDNA e o potencial patogênico das culturas clonadas foi avaliado por meio de ensaios de termotolerância e osmotolerância. Foram cultivadas em ágar 90 amostras ambientais, 16 de raspado de córnea e nove de lentes de contato (LC). Dessas, 38 (33 ambientais, quatro clínicas e uma de LC) foram positivas para *Acanthamoeba*, sendo obtidos 28 clones (24 ambientais, três clínicos e um de LC). Dentre eles, 26 apresentaram características morfológicas do grupo II, um do grupo I (solo) e um clone (água potável) não foi classificado de acordo com os parâmetros morfológicos de classificação. Quatro casos de ceratite amebiana foram confirmados somente por diagnóstico molecular. Todos os isolados clínicos, o de LC e a maioria dos isolados ambientais sequenciados foram classificados como pertencentes ao genótipo T4. Dentre os isolados ambientais, dois foram agrupados no genótipo T11 (piscina) e um no T1 (poeira). Todos os isolados clonados submetidos aos ensaios de termotolerância apresentaram crescimento a 28°C e a 37°C. Em contrapartida, nenhum isolado cresceu a 42°C. Nos testes de osmotolerância, todos os isolados se desenvolveram a 0,1M e a 0,5M de manitol e a maioria deles cresceu à concentração de 1,0M. Os resultados deste estudo pioneiro no Espírito Santo confirmam a predominância do grupo morfológico II e do genótipo T4 em isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba* e relata pela primeira vez no Brasil o isolamento de *Acanthamoeba* pertencente ao genótipo T1. Este trabalho demonstra também a presença de isolados potencialmente patogênicos no ambiente, inclusive em amostras de água de inundação e de água do mar, o que pode representar um fator de risco para o desenvolvimento de infecções causadas por *Acanthamoeba*. Além disso, a metodologia desenvolvida neste estudo poderá ser utilizada para um diagnóstico mais rápido, sensível e específico de ceratite por *Acanthamoeba*.

Palavras-chave: *Acanthamoeba*, isolamento, genotipagem, termotolerância, osmotolerância.

ABSTRACT

The genus *Acanthamoeba* comprises amphizoic protozoa with a wide environment distribution. They can cause serious diseases in humans, such as amoebic keratitis and granulomatous amoebic encephalitis. Thus, the factors involved in the pathogenicity of *Acanthamoeba* are being investigated as major interests to identify strains able to cause infection. The aim of this study was to investigate the occurrence of *Acanthamoeba* both in clinical and environmental samples, characterize the isolates by morphological parameters, genotyping and also evaluate the pathogenic potential. Clinical samples were collected from patients with a suspicious diagnosis of amoebic keratitis throughout corneal scrapings. Environmental samples were collected from dust, soil, swimming pool, tap, sea, and flood waters in Vitoria metropolitan regions, Espirito Santo State, Brazil. All samples were cultured on soy agar. Samples from corneal scrapings were also collected in Page saline and subjected to a reaction of semi-nested PCR. Positive cultures for *Acanthamoeba*, previously identified based on the cysts and trophozoites morphology, were selected, cloned and classified into morphological groups I, II or III. Genotyping of isolates was performed by partially sequencing the 18S rDNA gene while the pathogenic potential of cloned cultures was assessed by thermo and osmotolerance assays. From all samples cultured on agar, 90 were from environmental sources, 16 from corneal scrapings and nine from contact lenses (CL). Of these, 38 (33 from environmental samples, four from clinical samples and one from CL sample) were positive for *Acanthamoeba*. Among the 38 positive isolates, 28 were successfully cloned (24 from environmental isolates, three from clinical isolates and one from CL isolate). Twenty six cloned samples showed morphological characteristics of group II, one of group I (soil) and one (tap water) could not be classified according to morphological parameters. Four cases of amoebic keratitis could only be confirmed by molecular diagnosis. All clinical, CL and most of the environmental isolates sequenced were classified as T4 genotype. Among the environmental isolates, two were grouped in genotype T11 (pool) and one in T1 (dust). All cloned isolates subjected to the thermotolerance assay grew at 28 °C and 37 °C. The same result was observed in osmotolerance tests at 0.1M and 0.5M mannitol. Nevertheless, while most of the cloned isolates were able to grow at 1.0M mannitol, none of the isolates were able to grow at 42 °C. The present study confirms the predominance of morphological group II and genotype T4 in clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* in Espirito Santo State and first time reports the T1 genotype isolation of *Acanthamoeba* in Brazil. This work also demonstrates the presence of potentially pathogenic isolates at the environment, including samples of flood and sea waters, which may represent a risk factor for the development of infections caused by *Acanthamoeba*. Furthermore, the methodology used in this study could be used for a fast, sensitive and specific diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis.

Keywords: *Acanthamoeba*, isolation, genotyping, thermotolerance, osmotolerance.

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1: Formas evolutivas de <i>Acanthamoeba</i> : (a) trofozoíto com acantapódios (A), vacúolos contráteis (VC) e núcleo (N) com nucléolo central (Nc); (b) cistos com parede dupla (En: endocisto; Ec: ectocisto; Os: ostíolo). Barra: 20µm ^l . Fonte: modificado de Costa et al (2010).	22
Figura 2: Classificação taxonômica clássica de <i>Acanthamoeba</i> . Fonte: modificado de Khan (2006).	25
Figura 3: Cistos de <i>Acanthamoeba</i> demonstrando características típicas dos grupos morfológicos de Pussard e Pons (1977). (a) (b) cistos característicos do grupo I, apresentando endocisto estrelado e ectocisto liso ou levemente ondulado. (b) (c) cistos característicos do grupo II, apresentando endocisto poliédrico e ectocisto ondulado e irregular. (e) (f) cistos característicos do grupo III, apresentando endocisto oval ou levemente angular e ectocisto fino e liso ou fracamente ondulado. Barra: (a) (c) (d) (e) (f) 10 µm; (b) 20 µm ^l . Fonte: (a) Nuprasert et al (2010); (b) Costa et al (2010); (c) (d) Nagyová et al (2010); (e) Chan et al (2011); (f) Nagyová et al (2010).	26
Figura 4: Pacientes com ceratite por <i>Acanthamoeba</i> exibindo opacidade de córnea (a) e infiltração no estroma em forma de anel (b) . Fonte: (a) Syam et al (2005); (b) Abelson et al (2008).	32
Figura 5: Pontos de coleta das amostras de poeira (R ₁ , R ₂ e R ₃), solo (A ₁ , A ₂ e A ₃), piscina (P ₁ a P ₂ , P ₃ , P ₄ , P ₅ , P ₆ , P ₇ , P ₈ , P ₉ e P ₁₀), água potável (RA ₁ , RA ₂ , RA ₃ , RA ₄ e RA ₅) e água de inundação (I ₁ , I ₂ , I ₃ , I ₄ , I ₅ , I ₆ , I ₇ , I ₈ , I ₉ e I ₁₀) em Vitória e região metropolitana (ES). Fonte: Google Earth (2012).	42
Figura 6: Pontos de coleta (01, 02A, 04, 06, 08, 09, 10, 11, 12 e 13) das amostras de água do mar na Praia da Curva da Jurema (A), Praia do Canto (B) e Praia de Camburi (C) (Vitória-ES). Fonte: Google Earth (2012).	43
Figura 7: Fluxograma de procedimentos para isolamento e clonagem de <i>Acanthamoeba</i> em culturas de amostras clínicas e ambientais.	45
Figura 8: Cistos e trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> do isolado AAO-1 demonstrando aspectos morfológicos típicos do gênero: (a) cistos com parede dupla (En: endocisto poligonal; Ec: ectocisto ondulado); (b) trofozoíto com acantapódios típicos (A) e vacúolo contrátil evidente (VC). Barra: 10µm.	52
Figura 9: Cistos de isolados clonados de <i>Acanthamoeba</i> demonstrando características típicas dos grupos de Pussard e Pons (1977) e variações morfológicas entre cistos pertencentes ao mesmo isolado clonado. (a) Isolado RA ₃ P ₂ -2 demonstrando características dos grupos II e III (endocisto oval e ectocisto ondulado); (b) Isolado A ₁ P ₁ -2 demonstrando características do grupo I (endocisto estrelado e ectocisto liso); (c) (d) (e) (f) Isolados I ₂ -1, AAO-1, A ₃ P ₂ -2 e M9-1, respectivamente, demonstrando características do grupo II (endocisto poliédrico e ectocisto ondulado). Barra: 10µm.	58
Figura 10: Resultado da amplificação por PCR do gene 18S rDNA das amostras de raspado de córnea esgotadas em salina de Page de quatro pacientes com suspeita de ceratite amebiana. O produto esperado, de tamanho entre 423 e 551pb, foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% e visualizado por coloração com nitrato de prata. CN: controle negativo; 1: marcador 100pb; 2: paciente ZCS; 3: paciente JSR; 4: paciente AAO; 5: paciente TMR.	61

Figura 11: Resultado da amplificação dos produtos de PCR pela snPCR das amostras de raspado de córnea esgotadas em salina de Page de quatro pacientes com suspeita de ceratite amebiana. O produto esperado, de tamanho entre 120 e 160pb, foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% e visualizado por coloração com nitrato de prata. **1:** marcador 100pb; **2:** paciente ZCS; **3:** paciente JSR; **4:** paciente AAO; **5:** paciente TMR; **CNsn:** controle negativo da snPCR; **CN:** controle negativo da PCR submetido à snPCR. **61**

Figura 12: Resultado da amplificação por PCR do gene 18S rDNA de isolados clonados de *Acanthamoeba* provenientes de amostras ambientais. O produto esperado, de tamanho entre 423 e 551pb, foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% e visualizado por coloração com nitrato de prata. **1:** marcador 100pb; **2:** isolado P₁P₂-1 (piscina); **3:** isolado P₄P₂-1 (piscina); **4:** isolado A₁P₁-2 (solo); **5:** isolado A₂P₂-1 (solo); **6:** controle negativo. **62**

Figura 13: Resultado da amplificação por PCR do gene 18S rDNA de isolados clonados de *Acanthamoeba* provenientes de amostras ambientais. O produto esperado, de tamanho entre 423 e 551pb, foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% e visualizado por coloração com nitrato de prata. **1:** marcador 100pb; **2:** controle negativo; **3:** isolado RA₃P₂-2 (água potável); **4:** isolado RA₁P₂-1 (água potável); **5:** isolado R₂P₁-1 (poeira); **6:** isolado R₃P₂-1 (poeira); **7:** isolado M9-1 (mar); **8:** isolado M10-2 (mar); **9:** isolado I1-1 (inundação); **10:** isolado I2-1 (inundação). **62**

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 1: Resultado da cultura das amostras de raspado de córnea dos pacientes com suspeita de ceratite amebiana atendidos no Setor de Oftalmologia do HUCAM em Vitória (ES) no período de 2010-2012 com procedência e histórico de uso de lentes de contato.	51
Tabela 2: Resultado da cultura de dez amostras de poeira coletadas em Vitória e região metropolitana (ES).	53
Tabela 3: Resultado da cultura de dez amostras de solo coletadas em Vitória e região metropolitana (ES).	53
Tabela 4: Resultado da cultura de 30 amostras de piscina (água, sedimento do filtro e da escada) coletadas em Vitória e região metropolitana (ES).	54
Tabela 5: Resultado da cultura de 20 amostras de água potável (água e biofilme da torneira) coletadas em Vitória e região metropolitana (ES).	55
Tabela 6: Resultado da cultura de dez amostras de água de inundação coletadas em Vitória e região metropolitana (ES).	56
Tabela 7: Resultado da cultura de dez amostras de água do mar coletadas em Vitória (ES).	57
Tabela 8: Classificação morfológica de isolados clonados de <i>Acanthamoeba</i> provenientes de amostras clínicas e ambientais e aspectos morfológicos dos cistos.	59
Tabela 9: Resultado da cultura, da PCR e da snPCR das amostras de raspado de córnea dos pacientes com suspeita de ceratite amebiana atendidos no Setor de Oftalmologia do HUCAM em Vitória (ES) no período de 2010-2012.	60
Tabela 10: Classificação genotípica dos isolados clonados de <i>Acanthamoeba</i> provenientes de amostras clínicas e ambientais e a porcentagem de similaridade obtida com as cepas de referência depositadas no <i>GenBank</i> .	64
Tabela 11: Identificação das espécies de <i>Acanthamoeba</i> dos isolados clonados provenientes de amostras clínicas e ambientais e a porcentagem de similaridade obtida com as cepas de referência depositadas no <i>GenBank</i> .	65
Tabela 12: Resultado dos ensaios de termotolerância e de osmotolerância nos isolados clonados de <i>Acanthamoeba</i> provenientes de amostras clínicas e ambientais.	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*)

ASA.S1 - *Acanthamoeba Specific Amplimer S1*

AVL - Amebas de Vida Livre

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA - Albumina de Soro Bovino (*Bovine Serum Albumin*)

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

DNA - Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)

dNTP - Desoxirribonucleotídeo trifosfato (*Deoxyribonucleotide triphosphate*)

DP - Desvio Padrão

EAG - Encefalite Amebiana Granulomatosa

EDTA - Ácido etilenodiaminotretacético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)

HI-DI - Altamente Deionizada (*Highly Deionized*)

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

HUCAM - Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes

MEGA - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

pb - pares de base

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

pH - potencial hidrogeniônico

PVC - Policloreto de vinila (*Polyvinyl chloride*)

PVPP - Polivinilpolipirrolidona

PYG - Peptona, Extrato de Levedura e Glicose (*Peptone, Yeast Extract and Glucose*)

qsp - quantidade suficiente para

RAPD - Reação de Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

rDNA - DNA ribossômico (*ribosomal DNA*)

RFLP - Polimorfismos de Comprimentos de Fragmentos de Restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RNase - Ribonuclease

SDS - Dodecil sulfato de sódio (*Sodium dodecyl sulfate*)

SNC - Sistema Nervoso Central

snPCR - semi-nested PCR

ssu - subunidade menor (*small subunit*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
<u>2.1 Amebas de vida livre potencialmente patogênicas</u>	19
<u>2.2 O gênero <i>Acanthamoeba</i></u>	21
2.2.1 Morfologia e ciclo de vida	21
2.2.2 Distribuição ambiental	22
2.2.3 Classificação taxonômica	24
2.2.3.1 Classificação morfológica	25
2.2.3.2 Classificação molecular	27
2.2.4 Infecções causadas por <i>Acanthamoeba</i>	28
2.2.4.1 Encefalite amebiana granulomatosa	29
2.2.4.2 Ceratite amebiana	30
2.2.5 <i>Acanthamoeba</i> como reservatório de patógenos	33
2.2.6 Isolamento em cultura	34
2.2.7 Determinação do potencial patogênico	36
3 OBJETIVOS	39
<u>3.1 Objetivo geral</u>	39
<u>3.2 Objetivos específicos</u>	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
<u>4.1 Coleta de amostras e isolamento de <i>Acanthamoeba</i></u>	40
4.1.1 Amostras clínicas	40
4.1.2 Amostras ambientais	41
4.1.3 Identificação de <i>Acanthamoeba</i> e cultivo dos isolados	43
4.1.4 Clonagem	44
<u>4.2 Classificação morfológica dos isolados clonados</u>	46
<u>4.3 Identificação molecular</u>	46
4.3.1 Extração de DNA	46
4.3.2 PCR do gene 18S rDNA	46
<u>4.4 Classificação genotípica</u>	48
<u>4.5 Ensaios de patogenicidade nos isolados clonados</u>	49
4.5.1 Termotolerância	49
4.5.2 Osmotolerância	49
5 RESULTADOS	51
<u>5.1 Coleta de amostras e isolamento de <i>Acanthamoeba</i></u>	51
5.1.1 Amostras clínicas	51
5.1.2 Amostras ambientais	52
<u>5.2 Classificação morfológica dos isolados clonados</u>	57
<u>5.3 Identificação molecular</u>	59
5.3.1 Diagnóstico molecular das amostras clínicas	59
5.3.2 Confirmação do gênero <i>Acanthamoeba</i> nas amostras clonadas	61
<u>5.4 Classificação genotípica</u>	63
<u>5.5 Ensaios de patogenicidade</u>	66

6 DISCUSSÃO.....	67
7 CONCLUSÃO.....	86
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
9 ANEXOS.....	113

1 INTRODUÇÃO

Amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* (Amoebozoa) são protozoários ubíquos no ambiente que sobrevivem na natureza principalmente como predadores de bactérias. Sob determinadas condições, no entanto, essas amebas podem assumir o papel ecológico de parasitas, causando no homem doenças graves e algumas vezes fatais (KHAN, 2006). Em indivíduos imunocomprometidos causam uma série de infecções sistêmicas, incluindo a encefalite amebiana granulomatosa, doença usualmente fatal (STEINBERG et al, 2002; BLOCH e SCHUSTER, 2005). Por outro lado, a ceratite causada por *Acanthamoeba*, infecção progressiva, de difícil tratamento e que pode levar à cegueira, acomete indivíduos imunologicamente competentes, tendo como principal fator de risco o uso de lentes de contato (CHEW et al, 2011). Além disso, *Acanthamoeba* pode servir de reservatório para vários microorganismos patogênicos para o homem, como vírus, leveduras, bactérias e protozoários, contribuindo para a sobrevivência e dispersão dos mesmos no ambiente (KHAN, 2009).

Todas as espécies de *Acanthamoeba* são definidas segundo parâmetros morfológicos e classificadas de acordo com as características de seus cistos em três grupos, numerados de I a III, como descrito por Pussard e Pons (1977) (VISVESVARA et al, 2007). No entanto, estudos moleculares recentes baseados na sequência do gene 18S rDNA demonstram que o gênero *Acanthamoeba* compreende 17 genótipos diferentes, o que tem permitido uma classificação mais precisa e coerente dos isolados (STOTHARD et al, 1998; CORSARO e VENDITTI, 2010; NUPRASERT et al, 2010).

Como os mecanismos associados à patogenia das doenças causadas por *Acanthamoeba* não são completamente conhecidos, laboratórios de pesquisa no mundo todo buscam por possíveis relações existentes entre os diferentes genótipos e a capacidade de *Acanthamoeba* causar infecção. Além disso, vários outros parâmetros relacionados à biologia dessas amebas têm sido investigados e testados com o objetivo de determinar marcadores adequados para a identificação de isolados potencialmente patogênicos (KILIC et al, 2004; DA ROCHA-AZEVEDO e COSTA e SILVA-FILHO, 2007).

Levando em consideração a crescente população de usuários de lentes de contato, o aumento do número de indivíduos imunocomprometidos e o fato de que *Acanthamoeba* está presente em uma grande variedade de habitats, a discriminação entre cepas patogênicas e não patogênicas é fundamental para se avaliar o risco de infecção humana, bem como realizar o

diagnóstico das infecções causadas por esses protozoários (WALOCHNIK et al, 2000b; SPANAKOS et al, 2006; VISVESVARA e SCHUSTER, 2008).

Embora *Acanthamoeba* já tenha sido isolada de alguns ambientes no Brasil, ainda são poucos os dados que se tem a respeito do potencial patogênico desses isolados, assim como os estudos que determinam a classificação genotípica dos mesmos, sendo que quase não há informação sobre o isolamento e a caracterização de cepas clínicas obtidas no Brasil. Neste contexto, este trabalho se propõe a determinar a presença de *Acanthamoeba* em amostras clínicas e ambientais em Vitória e região metropolitana (ES) e realizar a genotipagem dos isolados obtidos, além de utilizar determinantes fisiológicos, como o crescimento em temperaturas e osmolaridades aumentadas, para inferir sobre o potencial patogênico dos isolados. Além disso, este trabalho pretende contribuir com informações que possam aperfeiçoar o diagnóstico de ceratite amebiana no Estado, de modo a suprir a demanda que existe atualmente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Amebas de vida livre potencialmente patogênicas

Amebas de Vida Livre (AVL) potencialmente patogênicas são protozoários que, embora sejam organismos que existam naturalmente sob a forma de vida livre, também possuem a capacidade de sobreviver como parasitas, causando infecções no homem e em outros animais, sendo, por isso, chamadas de amebas anfitriãs (MARTINEZ e JANITSCHKE, 1985; VISVESVARA e SCHUSTER, 2008).

Sabe-se atualmente que AVL potencialmente patogênicas são aquelas pertencentes aos gêneros *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* e *Sappinia*. Dentre as espécies descritas de *Naegleria*, somente *Naegleria fowleri* é responsável por casos de meningoencefalite amebiana primária, uma infecção aguda e fulminante que acomete indivíduos jovens e saudáveis; várias espécies de *Acanthamoeba* causam encefalite, infecção da córnea, do pulmão, da pele e de vários outros órgãos; *Balamuthia mandrillaris* também é reconhecida por causar encefalite e infecções da pele e do pulmão, além de infecções sistêmicas. Tanto *Acanthamoeba* como *Balamuthia* causam doenças em indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes; e recentemente, o gênero *Sappinia* foi identificado como agente etiológico de encefalite em um paciente sem qualquer comprometimento imunológico (SCHUSTER e VISVESVARA, 2004; VISVESVARA, 2010).

Dentre essas AVL, *Naegleria* foi o primeiro gênero a ser isolado, sendo inicialmente descrito como *Amoeba* por Sharding (1899) e posteriormente como *Naegleria* por Alexeiff (1912) (DE JONCKHEERE, 2002). No entanto, somente em 1958 foi relatado pela primeira vez o potencial patogênico das AVL. Após a contaminação de culturas de células utilizadas para a produção de uma vacina contra a poliomielite, Culbertson et al (1958), na tentativa de identificar e testar o potencial patogênico dos agentes contaminantes, inocularam em camundongos e macacos uma suspensão dessas culturas. Dentro de poucos dias após a inoculação, foi observado o desenvolvimento de quadros fatais de encefalite nesses animais, e a demonstração de cistos e trofozoítos em tecidos do cérebro e da medula espinhal dos mesmos revelaram que amebas eram os agentes causadores da infecção e, portanto, eram os organismos que haviam contaminado as culturas celulares. Essas amebas foram identificadas posteriormente como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*, descrito até então como não patogênico (CULBERTSON et al, 1959; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003).

O primeiro relato de doença humana causada por AVL foi descrito em 1965 por Fowler e Carter, quando um caso de meningoencefalite ocorreu na Austrália. O agente etiológico da infecção, primeiramente identificado como *Acanthamoeba*, foi reconhecido posteriormente como *Naegleria fowleri*. Logo em seguida, Butt (1966) relatou o primeiro caso de infecção causada por *N. fowleri* nos Estados Unidos e o termo meningoencefalite amebiana primária passou a ser utilizado para descrever a doença (SCHUSTER e VISVESVARA, 2004). Desde então, vários casos de doenças causadas por AVL têm sido descritos no mundo todo (LORENZO-MORALES et al, 2011).

Em 1972, Janger e Stamm descreveram pela primeira vez em humano um caso de encefalite amebiana granulomatosa causada por *Acanthamoeba* (KHAN, 2006). Alguns anos depois, foram relatados os primeiros casos de ceratite por *Acanthamoeba*, o primeiro no Reino Unido, por Nagington et al em 1974, e o segundo nos Estados Unidos, por Jones et al em 1975 (SCHUSTER e VISVESVARA, 2004). No Brasil, os primeiros casos de infecções da córnea causadas por *Acanthamoeba* foram descritos por Nosé et al em 1988 (CARVALHO et al, 2009).

O gênero *Balamuthia* e a espécie *Balamuthia mandrillaris* foram descritos pela primeira vez em 1993 a partir de um isolado amebiano (inicialmente identificado como *Leptomyxa*) obtido do cérebro de uma fêmea de babuíno grávida que havia morrido anos antes devido a uma meningoencefalite. A partir daí e com o desenvolvimento de anticorpos anti-*Balamuthia*, vários casos de encefalite causados por essa ameba foram diagnosticados retrospectivamente por meio de testes de imunofluorescência indireta (VISVESVARA et al, 1990, 1993; VISVESVARA, 2010). Desde então, casos de encefalite no homem e em outros animais, embora raros, têm sido descritos (DENNEY et al, 1997; KINDE et al, 1998; TAVARES et al, 2006). Até o momento, *B. mandrillaris* é a única espécie pertencente ao gênero (LORENZO-MORALES et al, 2011).

Em 2001, o gênero *Sappinia* foi descrito como o agente causador de um quadro de encefalite em um homem imunocompetente, tornando-se mais um gênero de AVL reconhecidamente anfitriônico. A ameba foi primeiramente descrita como *S. diploidea*, sendo recentemente identificada como *S. pedata* por técnicas moleculares. Atualmente, somente essas duas espécies de *Sappinia* são reconhecidas e nenhum outro caso de doença causada por essa ameba foi relatado (QVARNSTROM et al, 2009; DIAZ, 2010; VISVESVARA, 2010).

2.2 O gênero *Acanthamoeba*

2.2.1 Morfologia e ciclo de vida

Espécies do gênero *Acanthamoeba* apresentam em seu ciclo de vida uma fase trofozoítica (**Figura 1a**), que é a forma vegetativa da ameba, e uma fase cística (**Figura 1b**), que representa a forma de resistência da mesma (CHÁVEZ-MUNGUÍA et al, 2005; VISVESVARA et al, 2007; FOUQUE et al, 2012).

O tamanho dos trofozoítos varia de 15 a 50 µm, dependendo da espécie analisada. Caracterizam-se principalmente pela presença de projeções na membrana plasmática que se apresentam sob a forma de espinhos superficiais, denominados acantapódios (**Figura 1a**) (VISVESVARA et al, 2007). Essas estruturas são importantes para locomoção, captura de alimento e adesão a superfícies. O citoplasma é granuloso e apresenta um ou mais vacúolos contráteis evidentes (**Figura 1a**) (PRESTON et al, 2001; KHAN 2006). São aeróbicos (LLOYD et al, 1983) e se alimentam de bactérias, algas e leveduras por fagocitose e de matéria orgânica líquida por pinocitose (KHAN 2006; GONZÁLEZ-ROBLES et al, 2009; SMITH et al, 2010). A reprodução é assexuada e ocorre por divisão binária (VISVESVARA et al, 2007; VISVESVARA e SCHUSTER, 2008). Geralmente, trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba* apresentam somente um núcleo, com um grande e denso nucléolo central (**Figura 1a**) (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; FOUQUE et al, 2012).

Os cistos variam de 10 a 25 µm de diâmetro e apresentam parede dupla, formada pelo endocisto (parede interna) e pelo ectocisto (parede externa) (**Figura 1b**). De forma geral, o endocisto é mais espesso e contém celulose, podendo se apresentar de diversas formas, que variam de esférica a estrelada, enquanto que o ectocisto é fino e enrugado, sendo composto principalmente por proteínas (**Figura 1b**) (VISVESVARA et al, 2007). A parede dupla dos cistos de *Acanthamoeba* se caracteriza pela presença de junções esparsas entre o endocisto e o ectocisto, que variam em número de acordo com a espécie e a cepa analisada. Essas junções são denominadas poros ou ostíolos (**Figura 1b**) e cada um deles é obturado por um opérculo, estrutura que possibilita a liberação do trofozoíto durante o processo de desencistamento, que ocorre quando as condições do meio são favoráveis (PUSSARD e PONS, 1977; CHÁVEZ-MUNGUÍA et al, 2005).

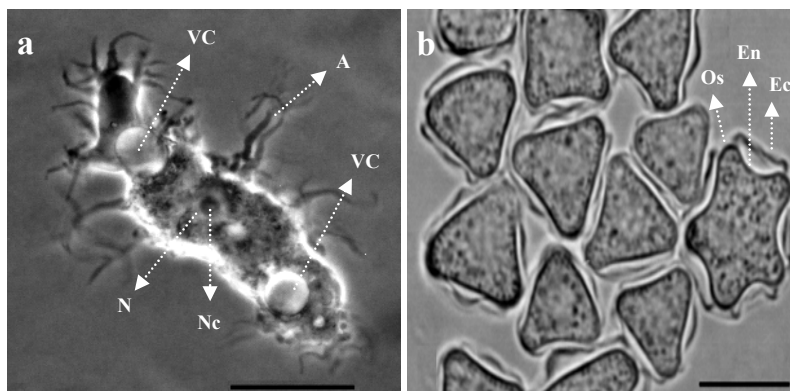


Figura 1: Formas evolutivas de *Acanthamoeba*: **(a)** trofozoíto com acantapódios (A), vacúolos contráteis (VC) e núcleo (N) com nucléolo central (Nc); **(b)** cistos com parede dupla (En: endocisto; Ec: ectocisto; Os: ostíolo). Barra: 20 μ m¹.

Fonte: modificado de Costa et al (2010).

Em contrapartida, o encistamento ocorre sob condições ambientais adversas, como falta de nutrientes, dessecação e mudanças de pH, temperatura e osmolaridade (CHAGLA e GRIFFITHS, 1974; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; KHAN, 2006). A fase cística de *Acanthamoeba* é reconhecida por suportar uma variedade de condições físicas e químicas extremas, incluindo elevadas doses de radiação gama e ultravioleta, altas temperaturas, congelamento em nitrogênio líquido e presença de desinfetantes e antimicrobianos (KILVINGTON, 1989; AKSOZEK et al, 2002; COULON et al, 2010). A grande resistência dos cistos, além de conferir proteção à ameba, é importante também para a dispersão e persistência do gênero no ambiente (CHÁVEZ-MUNGUÍA et al, 2005; FOUQUE et al, 2012). Já foi demonstrado, por exemplo, que cistos de *Acanthamoeba* podem permanecer viáveis *in vitro* durante 24 meses a temperatura ambiente, 8 meses a -10 °C (BIDDICK et al, 1984) e após 21 anos de dessecação (SRIRAM et al, 2008).

2.2.2 Distribuição ambiental

Dentre as AVL, o gênero *Acanthamoeba* é o mais encontrado no ambiente. A distribuição cosmopolita e a ubiquidade do mesmo permitem que essas amebas sejam isoladas dos mais diversos habitats, constituindo talvez o grupo de protozoários de vida livre mais abundante na natureza (PAGE, 1988).

¹ No artigo original foi colocado erroneamente que o tamanho da barra corresponde a 20 mm.

Já foi demonstrado o isolamento de *Acanthamoeba* de praticamente todos os ambientes, como solo (NACAPUNCHAI et al, 2001; LORENZO-MORALES et al, 2005b; REZAEIAN et al, 2008); água doce de rios e lagos (JOHN e HOWARD, 1995; NACAPUNCHAI et al, 2001; MAGNET et al, 2012); água do mar, areia, sedimento do oceano e de áreas salobras (SAWYER et al, 1977; LORENZO-MORALES et al, 2005a, b); sistemas de tratamento de água e esgoto (MAGNET et al, 2012); de ambientes domésticos, como poeira, água potável, pias e torneiras (SEAL et al, 1992; JEONG e YU, 2005; SHOFF et al, 2008); de poeira hospitalar (SILVA e ROSA, 2003; CARLESSO et al, 2010; COSTA et al, 2010); aparelhos de ar condicionado (CHAN et al, 2011); piscinas (GÓRNIK e KUZANAGRYGIEL, 2004; CAUMO et al, 2009; INIT et al, 2010) e até mesmo de água mineral engarrafada (SALAZAR et al, 1982) e do ar (KINGSTON e WARHURST, 1969). Já foi encontrada também em unidades de tratamento dentário (BARBEAU e BUHLER, 2001), em unidades hospitalares de tratamento oftalmológico (REZAEIAN et al, 2008) e em lentes de contato e nas soluções de limpeza e estojos de armazenamento das mesmas (WALOCHNIK et al, 2000b; JEONG e YU, 2005; YERA et al, 2008).

Também é comum o isolamento de *Acanthamoeba* a partir de tecidos de vertebrados assintomáticos, sem estar relacionada a processos infecciosos. Dessa forma, essas amebas já foram isoladas, por exemplo, de tecidos saudáveis de peixes (IM e SHIN, 2003) e de mamíferos (LORENZO-MORALES et al, 2007). Cerva et al (1973) e Badenoch et al (1988) isolaram *Acanthamoeba* da cavidade nasal de pessoas sem qualquer comprometimento aparente das vias aéreas e já foi demonstrado que anticorpos contra *Acanthamoeba* podem ser detectados em mais de 80% da população saudável, o que sugere um frequente contato do homem com esses organismos, provavelmente devido à ubiquidade dos mesmos na natureza (CHAPPELL et al, 2001; VISVESVARA, 2010).

No entanto, além da distribuição natural como protozoários de vida livre, muitas espécies de *Acanthamoeba* são capazes de sobreviver como parasitas do homem e de outros vertebrados (PAGE, 1988; VISVESVARA e SCHUSTER, 2008). Como patógenos, essas amebas já foram detectadas em uma grande variedade de amostras clínicas do homem, como lavado broncoalveolar (OLIVA et al, 1999), líquido cérebro-espinhal (PETRY et al, 2006), tecidos do cérebro e do pulmão (VISVESVARA et al, 1983), da pele (GALARZA et al, 2006), da córnea (WALOCHNIK et al, 2000a; LEDEE et al, 2009; MAGNET et al, 2012), entre outros. Vários autores também já relataram *Acanthamoeba* como agente etiológico de diversos tipos de infecções em aves (VISVESVARA et al, 2010), mamíferos (BAUER et al,

1993; WESTMORELAND et al, 2004; KINDE et al, 2007) e répteis (WALOCHNIK et al, 1999).

2.2.3 Classificação taxonômica

O primeiro isolado de *Acanthamoeba* foi obtido de amostras de poeira por Puschkarew em 1913, que o denominou de *Amoeba polyphagus*. Em 1931, Volkonsky criou a denominação do gênero *Acanthamoeba*. Após o reconhecimento do gênero pela comunidade científica, a ameba *Hartmannella castellanii*, isolada por Castellani em 1930 a partir de uma cultura de levedura contaminada, passou a ser descrita como *Acanthamoeba castellanii*. Anos depois, o isolado de amebas obtido por Culbertson et al (1958) como contaminante de uma cultura de células renais de macaco foi designado *Acanthamoeba culbertsoni*. Em 1967, Page renomeou *Amoeba polyphagus* como *Acanthamoeba polyphaga*. Desde então, com base em critérios morfológicos, várias espécies de *Acanthamoeba* já foram descritas (KHAN, 2006; VISVESVARA e SCHUSTER, 2008).

Em 2005, a Sociedade Internacional de Protozoologistas propôs um sistema de classificação para os eucariotos baseado em dados recentes de análises morfológicas, bioquímicas e moleculares. Segundo esse novo sistema, alguns termos taxonômicos clássicos não são mais reconhecidos, dentre eles, os grupos hierárquicos que dividem os organismos em reinos, filos, classes, ordens, entre outros. Dessa forma, foram criados seis Super Grupos, que incluem: Amoebozoa, Opisthokonta, Excavata, Rhizaria, Archaeplastida e Chromalveolata. A partir desses Super Grupos, os eucariotos foram então divididos em grupos menores, de acordo com a maior proximidade filogenética entre eles. Sendo assim, os quatro gêneros de AVL potencialmente patogênicos estão divididos entre o Amoebozoa (*Acanthamoeba*, *Balamuthia* e *Sappinia*) e o Excavata (*Naegleria*), sendo que para espécies de *Acanthamoeba* é utilizada a seguinte nomenclatura: *Acanthamoeba* [Amoebozoa: Acanthamoebidae], demonstrando a divisão do gênero em dois grupos taxonômicos (ADL et al, 2005).

No entanto, o critério mais utilizado para a classificação de *Acanthamoeba* ainda se baseia na taxonomia clássica, que divide o Sub-reino Protozoa em quatro grupos: Sarcodina, Mastigophora, Sporozoa e Infusoria (ADL et al, 2005; KHAN, 2006), como mostra a **Figura 2**.

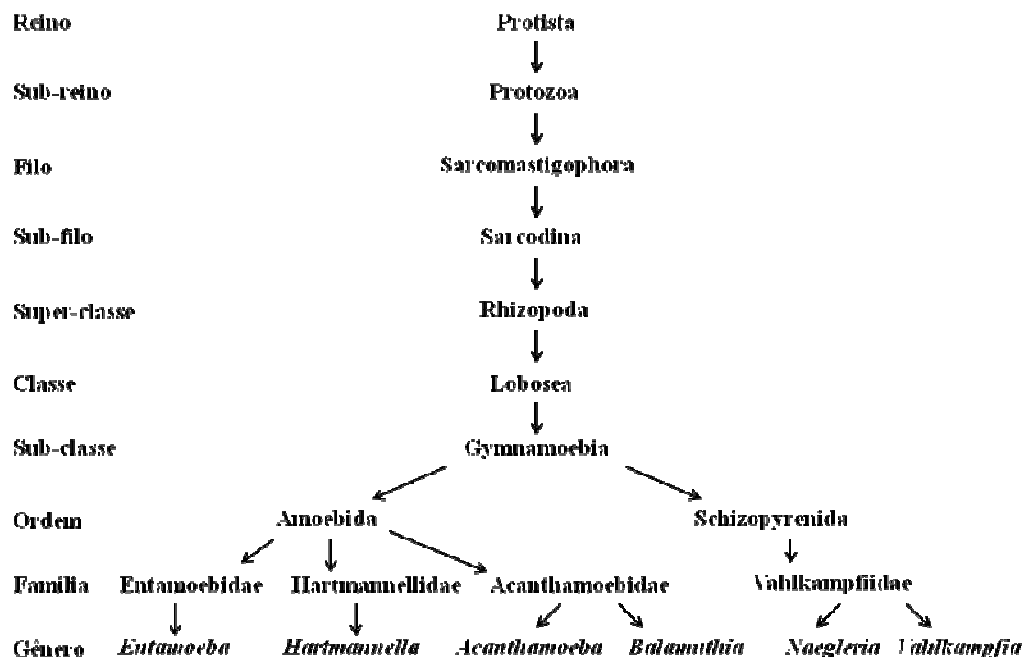


Figura 2: Classificação taxonômica clássica de *Acanthamoeba*.

Fonte: modificado de Khan (2006).

É importante ressaltar que até o momento a taxonomia de *Acanthamoeba* e das outras AVL não foi estabelecida de forma definitiva, estando sujeita a alterações, e esse fato se deve ao volume cada vez maior de dados provenientes do sequenciamento do DNA desses protozoários (BOOTON et al, 2003; LIU et al, 2005; CORSARO e VENDITTI, 2011).

2.2.3.1 Classificação morfológica

Reconhecendo a dificuldade de se estabelecer um único critério taxonômico para o gênero *Acanthamoeba* e com o objetivo de organizar o número crescente de isolados descritos, Pussard e Pons propuseram, em 1977, a divisão do gênero de acordo com as características morfológicas dos cistos. Dessa forma, as espécies de *Acanthamoeba* descritas até aquele momento foram agrupadas de acordo com o tamanho e a forma dos cistos. As espécies foram assim organizadas:

- **Grupo I:** espécies que apresentam cistos relativamente grandes quando comparados aos dos outros grupos ($\geq 18 \mu\text{m}$ de diâmetro) e que podem ser facilmente reconhecidos devido ao aspecto estrelado do endocisto, cujos braços são bem visíveis. O ectocisto possui contorno

circular, podendo ser liso ou levemente ondulado (**Figura 3-a, b**) (PUSSARD e PONS, 1977).

- **Grupo II:** espécies que possuem cistos com diâmetro médio menor que 18 μm , podendo apresentar um endocisto levemente estrelado, triangular, oval ou poliédrico. O ectocisto segue o contorno do endocisto e se apresenta ondulado e irregular (**Figura 3-c, d**). Neste grupo se encontra a maioria das espécies de *Acanthamoeba* (PUSSARD e PONS, 1977).

- **Grupo III:** compreende espécies cujos cistos têm diâmetro médio menor ou igual a 18 μm , sendo o endocisto oval ou levemente angular. O ectocisto é liso ou fracamente ondulado, fino e justaposto ao endocisto, sendo difícil de ser visualizado (**Figura 3-e, f**) (PUSSARD e PONS, 1977).

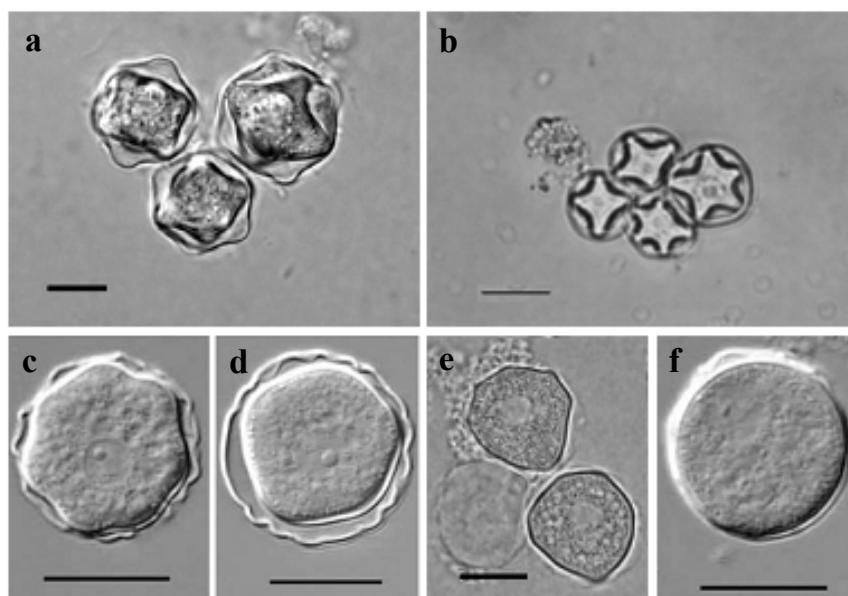


Figura 3: Cistos de *Acanthamoeba* demonstrando características típicas dos grupos morfológicos de Pussard e Pons (1977). **(a) (b)** cistos característicos do grupo I, apresentando endocisto estrelado e ectocisto liso ou levemente ondulado. **(b) (c)** cistos característicos do grupo II, apresentando endocisto poliédrico e ectocisto ondulado e irregular. **(e) (f)** cistos característicos do grupo III, apresentando endocisto oval ou levemente angular e ectocisto fino e liso ou fracamente ondulado. Barra: (a) (c) (d) (e) (f) 10 μm ; (b) 20 μm ¹.
Fonte: (a) Nuprasert et al (2010); (b) Costa et al (2010); (c) (d) Nagyová et al (2010); (e) Chan et al (2011); (f) Nagyová et al (2010).

¹ No artigo original foi colocado erroneamente que o tamanho da barra corresponde a 20 mm.

A classificação de *Acanthamoeba* em grupos morfológicos logo foi aceita por outros autores. Na chave dicotômica de Page (1988), por exemplo, a identificação de *Acanthamoeba* em nível de espécie foi realizada com base nos critérios propostos por Pussard e Pons (1977). Durante muitos anos, a morfologia dos cistos foi o único critério para a identificação e para a taxonomia do gênero (KHAN, 2006). Atualmente, mais de 24 espécies de *Acanthamoeba* são reconhecidas, todas elas descritas segundo suas características morfológicas (VISVESVARA et al, 2007).

2.2.3.2 Classificação molecular

A necessidade de novos critérios para a classificação de *Acanthamoeba* não é recente e surgiu quando vários estudos começaram a demonstrar as inconsistências e a subjetividade da identificação específica de *Acanthamoeba* baseada unicamente em parâmetros morfológicos. Sabe-se, por exemplo, que a morfologia dos cistos é influenciada pelas condições de cultivo (PUSSARD e PONS, 1977; STRATFORD e GRIFFITHS, 1978; CHAN et al, 2011) e já foi demonstrado que culturas de amebas clonadas podem apresentar cistos com diferentes aspectos morfológicos (PAGE, 1988; COSTA et al, 2010; CHAN et al, 2011). Observa-se, ainda, que diferentes espécies apresentam características muito similares entre si, muitas vezes difíceis de serem distinguidas. Além disso, já foi demonstrado também que uma mesma espécie de *Acanthamoeba* pode ou não apresentar potencial patogênico (VISVESVARA, 1991; KHAN e TAREEN, 2003; LIU et al, 2005). Neste contexto, a classificação molecular de *Acanthamoeba* tem se tornando cada vez mais importante como ferramenta complementar à taxonomia clássica de identificação do gênero.

Nos últimos anos, com o objetivo de definir a taxonomia de *Acanthamoeba* e elucidar as relações filogenéticas entre as espécies, vários métodos bioquímicos e moleculares têm sido utilizados, tais como: análise de isoenzimas (IM et al, 1999; IM e SHIN, 2003; CARVALHO et al, 2011), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) do DNA total e mitocondrial (YU et al, 1999; ALVES et al, 2000; ORTEGA-RIVAS et al, 2003), RFLP e análise da sequência nucleotídica da subunidade menor do DNA ribossômico (ssu rDNA) (GAST et al, 1994; CHUNG et al, 1998; KONG, 2009), entre outros. No entanto, o emprego de muitas dessas técnicas só confirmou a diversidade inter e intra-específica que existe no gênero *Acanthamoeba*, não sendo possível o estabelecimento de critérios definitivos para a classificação do mesmo até o momento.

Atualmente, as metodologias mais aplicadas na identificação e nos estudos taxonômicos de *Acanthamoeba* se baseiam no sequenciamento do gene 18S rDNA. Analisando a sequência completa desse gene de 18 cepas de *Acanthamoeba*, Gast et al (1996) dividiram o gênero pela primeira vez em quatro genótipos diferentes (T1 a T4). Baseando-se neste estudo pioneiro, Stothard et al (1998) determinaram a classificação genotípica de 53 isolados de *Acanthamoeba*, com a identificação de oito novos tipos sequenciais, totalizando, então, 12 genótipos para *Acanthamoeba* (T1 a T12), separados quando uma dissimilaridade maior do que 5% era detectada entre as sequências. Posteriormente, Schroeder et al (2001) demonstraram que a utilização de somente algumas regiões altamente variáveis desse gene era suficiente para diferenciar os genótipos.

Desde então, vários autores têm utilizado essas variações na sequência do gene 18S rDNA para a classificação molecular de *Acanthamoeba* e, conseqüentemente, para tentar determinar as relações filogenéticas entre os genótipos descritos, obtendo-se, dessa forma, informações que permitam uma melhor compreensão da epidemiologia das infecções causadas por *Acanthamoeba* (BOOTON et al, 2002, 2005; MAGNET et al, 2012). Além disso, desde que foi proposta a divisão do gênero *Acanthamoeba* em 12 genótipos (STOTHARD et al, 1998), outros cinco foram descritos, totalizando, até o momento, 17 genótipos (T1 a T17) para o gênero (HORN et al, 1999; GAST, 2001; HEWETT et al, 2003; CORSARO e VENDITTI, 2010; NUPRASERT et al, 2010).

Devido ao difícil posicionamento taxonômico das espécies de *Acanthamoeba*, a classificação mais aceita atualmente integra o agrupamento morfológico proposto Pussard e Pons (1977) com a classificação molecular proposta por Stothard et al (1998).

2.2.4 Infecções causadas por *Acanthamoeba*

Embora vários tipos de infecções sistêmicas e oportunistas já tenham sido associadas a *Acanthamoeba*, como infecções da pele (SLATER et al, 1994), dos pulmões (AICHELBURG et al, 2008), do fígado (OLIVA et al, 1999), dos ossos (STEINBERG et al, 2002) e de vários outros órgãos (BARETE et al, 2007), a encefalite amebiana granulomatosa e a ceratite amebiana são consideradas as doenças mais importantes causadas por esses protozoários (KHAN, 2006).

2.2.4.1 Encefalite amebiana granulomatosa

A Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) é uma infecção crônica e progressiva do Sistema Nervoso Central (SNC) causada por várias espécies de *Acanthamoeba* (VISVESVARA et al 2007). Quase todos os casos descritos de EAG se referem a indivíduos imunologicamente comprometidos, como doentes crônicos, usuários de drogas, pessoas submetidas à terapia imunossupressora e pacientes com HIV/AIDS, tratando-se, portanto, de uma doença oportunista. Embora seja relativamente rara, é na maioria das vezes fatal (MARTINEZ et al, 2000; BLOCH e SCHUSTER, 2005; DUARTE et al, 2006).

Como o período de incubação da EAG pode variar de semanas a meses, a porta de entrada utilizada pela *Acanthamoeba* para a invasão do SNC é difícil de ser estabelecida (VISVESVARA et al 2007; VISVESVARA e SCHUSTER, 2008). Presume-se que essas amebas se disseminem por via hematogênica após o estabelecimento de infecções primárias na pele e no trato respiratório (VISVESVARA et al, 1983; MARTINEZ e JANITSCHKE, 1985; LACKNER et al, 2010).

Os sinais e sintomas mais comuns da infecção incluem dor de cabeça, febre, alterações do comportamento, náusea, vômitos, convulsões e hemiparesia. Em alguns casos, ocorre a diminuição gradativa da consciência e a doença evolui para o coma (MARTINEZ et al, 2000; SHENG et al, 2009; LACKNER et al, 2010). Os mecanismos associados com a patologia da infecção e o modo como ocorre a resposta imune do paciente ainda não estão totalmente esclarecidos. Sabe-se que as principais complicações da doença envolvem lesões necróticas hemorrágicas, irritação das meninges e edema cerebral (MARTINEZ e JANITSCHKE, 1985; MARTINEZ et al, 2000). Já foi demonstrado também que a forma granulomatosa típica da infecção nem sempre é observada, e isso acontece principalmente em pacientes com a resposta imune muito comprometida (SCHUSTER e VISVESVARA, 2004; LACKNER et al, 2010).

Embora a EAG seja normalmente uma infecção secundária, o envolvimento do SNC é fulminante, resultando no óbito do paciente dentro de poucos dias ou semanas (KHAN, 2006). Estima-se que aproximadamente 200 casos de EAG já tenham sido descritos, sendo que em menos de dez deles o paciente sobreviveu (SCHUSTER e VISVESVARA, 2004; SHENG et al, 2009; DIAZ, 2010).

O diagnóstico definitivo para a EAG é realizado pela demonstração de *Acanthamoeba* nos tecidos por meio de exames histopatológicos ou pelo isolamento em cultura. Geralmente são utilizadas amostras do líquido cérebro-espinhal e do tecido cerebral, mas em determinadas situações a biópsia da pele ou dos pulmões também pode ser utilizada (VISVESVARA et al, 1983; MARTINEZ et al, 2000; LACKNER et al, 2010). Embora a ressonância magnética e a tomografia computadorizada não forneçam um diagnóstico definitivo, esses métodos podem ajudar a localizar e reconhecer lesões causadas por *Acanthamoeba* (DUARTE et al, 2006; AICHELBURG et al, 2008; SHENG et al, 2009). Além disso, a sorologia também pode ser empregada para confirmar a suspeita da infecção por meio da constatação de altos níveis de anticorpos no sangue (KHAN, 2006; AICHELBURG et al, 2008; DA ROCHA-AZEVEDO et al, 2009). Recentemente, técnicas moleculares baseadas na PCR (*Polymerase Chain Reaction*) têm sido desenvolvidas e utilizadas para um diagnóstico mais rápido, sensível e específico de EAG (WALOCHNIK et al, 2008; DA ROCHA-AZEVEDO et al, 2009; SHENG et al, 2009).

A maioria das espécies causadoras de EAG está agrupada no genótipo T4, mas casos já foram descritos tendo como agente etiológico *Acanthamoeba* pertencente ao genótipo T1, T2, T5, T10 e T12 (BOOTON et al, 2005; WALOCHNIK et al, 2008; LACKNER et al, 2010; NUPRASERT et al, 2010).

2.2.4.2 Ceratite amebiana

A ceratite por *Acanthamoeba* é uma infecção progressiva e dolorosa da córnea que pode comprometer a visão de forma irreversível. Ao contrário do que acontece na EAG, a ceratite amebiana acomete principalmente indivíduos imunocompetentes (VISVESVARA e SCHUSTER, 2008).

O principal fator de risco para o desenvolvimento dessa infecção é o uso de lentes de contato associado à inadequada higiene das mesmas (BACON et al, 1993; MATHERS et al, 2000; SEAL, 2003). Segundo alguns autores, a presença de uma lesão prévia da córnea seria o primeiro fator predisponente para o estabelecimento da infecção. Estudos *in vivo* demonstram que animais com o epitélio da córnea intacto não são capazes de desenvolver o processo infeccioso (VAN KLINK et al, 1993). Dessa forma, além da lente de contato servir como carreadora da ameba, ela pode provocar também um microtraumatismo epitelial, facilitando a adesão do patógeno à córnea (ALVARENGA et al, 2000).

Nos últimos anos, devido ao crescente número de usuários de lentes de contato, a incidência de ceratite por *Acanthamoeba* tem aumentado significativamente (RADFORD et al, 2002). Embora os primeiros casos descritos não estivessem relacionados ao uso de lentes de contato, atualmente 85-90% do total de pacientes acometidos por essa infecção são usuários de lentes de contato (RADFORD et al, 2002; KILVINGTON et al, 2004). Apesar disso, o trauma ocular devido a outros agentes externos, como partículas de solo, plantas ou qualquer outro material que possa veicular *Acanthamoeba*, já é suficiente para desencadear o processo infeccioso e constitui a causa mais comum de ceratite amebiana entre os indivíduos que não fazem parte do grupo de risco. Sendo assim, a maioria dos casos de ceratite amebiana é unilateral, sendo poucos os casos descritos em que há o comprometimento dos dois olhos (OBEID et al, 2003; DI CAVE et al, 2009; KIM e KIM, 2010).

As condições inadequadas de uso, higiene e manutenção das lentes de contato que propiciam a contaminação por *Acanthamoeba* incluem: o uso prolongado das mesmas; nadar em lagos, piscinas, rios e mares e lavar os olhos com água de torneira usando lentes de contato; manuseio com mãos sujas; utilização de solução salina caseira ou água de torneira para a limpeza das lentes e dos estojos de armazenamento; desinfecção por tempo menor que o recomendado; reaproveitamento de lentes quebradas e arranhadas, entre outras. Essas condições podem levar ainda à formação de biofilmes nas lentes e nos estojos, que servem de alimento para as amebas. A falta de uma assepsia adequada associada a uma fonte abundante de nutrientes favorece o estabelecimento de *Acanthamoeba* e propicia a permanência da mesma na forma trofozoítica, que é a forma infectante (DUDLEY et al, 2005; GARATE et al, 2006; KHAN, 2006).

A aderência e a penetração dos trofozoítos no epitélio da córnea envolvem uma série de interações protéicas, síntese de fatores citopáticos e produção de enzimas proteolíticas, responsáveis pelas lesões características da infecção. Inicialmente, as amebas ficam restritas ao epitélio da córnea, causando pequenas lesões epiteliais, vermelhidão, lacrimejamento excessivo, dor intensa (desproporcional ao tamanho das lesões), fotofobia, ptose e edema de pálpebra e hiperemia conjuntival. À medida que a infecção progride, ocorrem ulcerações na córnea, formação de infiltrado perineural radial, perda da acuidade visual, invasão do estroma com formação de um infiltrado em anel e opacidade de córnea (**Figura 4**) (ALVARENGA et al, 2000; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; SEAL, 2003).

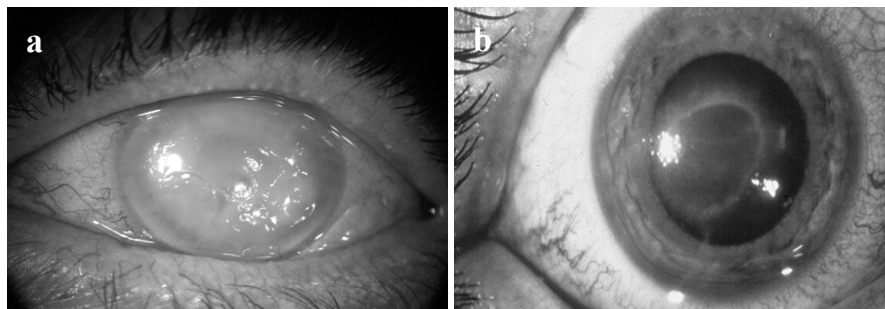


Figura 4: Pacientes com ceratite por *Acanthamoeba* exibindo opacidade de córnea (a) e infiltração no estroma em forma de anel (b).

Fonte: (a) Syam et al (2005); (b) Abelson et al (2008).

A ceratite por *Acanthamoeba* pode apresentar um bom prognóstico, desde que o diagnóstico seja realizado na fase inicial da infecção e o tratamento adequado seja estabelecido precocemente (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; SEAL, 2003). No entanto, é frequente o diagnóstico tardio e isso acontece devido à semelhança dos sinais e sintomas da ceratite amebiana com outras ceratites infecciosas, como a ceratite fúngica, a ceratite por *Pseudomonas aeruginosa* e a ceratite viral por *Herpes simplex* (BACON et al, 1993; SEAL, 2003). Além disso, durante as infecções amebianas da córnea é comum a ocorrência de infecções secundárias por fungos e bactérias, o que complica ainda mais o diagnóstico e o tratamento (BACON et al, 1993; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; SHARMA et al, 2000). O uso de antibióticos, antivirais, antifúngicos e corticóides, embora possa inicialmente conter a infecção por *Acanthamoeba*, altera o quadro clínico e contribui ainda mais para a progressão e o agravamento da infecção (ANDERSON et al, 1991; SHI et al, 2009).

Sendo assim, o diagnóstico clínico de ceratite amebiana por *Acanthamoeba* deve incluir os achados clínicos e a demonstração da presença da ameba nas lesões oculares (KHAN 2006). O padrão ouro para o diagnóstico laboratorial de ceratite amebiana é o isolamento do parasita em cultura, realizado principalmente a partir do raspado de córnea (BACON et al, 1993; LEHMANN et al, 1998). No entanto, devido à demora do resultado e à baixa sensibilidade desse método, várias técnicas moleculares têm sido propostas para a detecção de *Acanthamoeba* em amostras clínicas (VISVESVARA e SCHUSTER, 2008). Neste contexto, muitos autores têm utilizado a PCR do gene 18S rDNA para o diagnóstico molecular de ceratite amebiana (KHAN et al, 2001; DI CAVE et al, 2009; ABE e KIMATA, 2010).

Várias espécies de *Acanthamoeba* já foram relatadas como o agente causador de ceratite amebiana e apesar de já terem sido descritos 17 genótipos, somente T2, T3, T4, T5, T6, T10, T11 e T15 têm sido associados com ceratite (WALOCHNIK et al, 2000a; MAGHSOOD et al, 2005; LEDEE et al, 2009; DI CAVE et al, 2009; NUPRASERT et al, 2010), sendo que o genótipo T4 compreende a maioria dos casos (STOTHARD et al, 1998; WALOCHNIK et al, 2000 correlations; LEDEE et al, 2009).

2.2.5 *Acanthamoeba* como reservatório de patógenos

A possibilidade de associação entre *Acanthamoeba* e microorganismos patogênicos é outro aspecto relacionado a essas amebas de grande interesse em saúde pública. Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de compreender como esses microorganismos fagocitados são capazes de se manter viáveis dentro de cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba*, sendo transportados pelos mesmos para diferentes tipos de ambientes, aumentando a exposição do homem a esses agentes infecciosos. No entanto, essas interações são altamente complexas e dependem não só da virulência do organismo fagocitado, mas também da virulência da ameba e das condições ambientais (GREUB e RAOULT, 2004; KHAN, 2006, 2009).

Já foi demonstrado que várias bactérias patogênicas, como *Aeromonas* spp. (RAHMAN et al, 2008), *Legionella* spp. (DECLERCK et al, 2007), *Parachlamydia* sp. (SCHMITZ-ESSER et al, 2008), *Mycobacterium* spp. (ADÉKAMBI et al, 2006), *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori*, cepas patogênicas de *Escherichia coli*, entre várias outras, podem sobreviver no interior de *Acanthamoeba* (GREUB e RAOULT, 2004; KHAN, 2009). Além disso, já foi comprovado que algumas bactérias também são capazes de se multiplicar dentro da ameba, enquanto que a virulência de outras, como de *Legionella pneumophila* e *Mycobacterium avium*, pode aumentar após o ciclo intracelular (BARKER e BROWN, 1994; GREUB e RAOULT, 2004; THOMAS et al, 2010). Sugere-se que essa associação possa trazer também algum benefício para *Acanthamoeba*, como o aumento de sua virulência, ou resultar em uma relação de simbiose duradoura (KHAN, 2006; SIDDIQUI e KHAN, 2012).

Algumas espécies patogênicas de levedura também são capazes de sobreviver após serem fagocitadas por *Acanthamoeba*, tais como: *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, entre outras (KHAN, 2009; SIDDIQUI e KHAN, 2012). E

recentemente, foi reconhecida a capacidade de *Acanthamoeba* albergar vírus, como o vírus Coxsackie e o vírus *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*, que foi descrito pela primeira vez ao ser isolado de *Acanthamoeba polyphaga* (VISVESVARA e SCHUSTER, 2008; THOMAS et al, 2010; VINCENT et al, 2010). Vale ressaltar que a capacidade de *Acanthamoeba* fagocitar oocistos de *Cryptosporidium* sp. e dos mesmos se manterem viáveis dentro da célula também já foi demonstrada (KHAN, 2009).

Levando em consideração que cistos de *Acanthamoeba* resistem a várias condições ambientais adversas, bactérias, leveduras, vírus e protozoários patogênicos fagocitados acabam ficando protegidos da ação de antimicrobianos, desinfetantes e de outras condições desfavoráveis, como dessecação e altas temperaturas, o que favorece ainda mais a dispersão e permanência desses microorganismos no ambiente (KHAN, 2009; COULON et al, 2010; FOUQUE et al, 2012).

2.2.6 Isolamento em cultura

Embora *Acanthamoeba* possa ser isolada e mantida em laboratório em uma variedade de meios de cultura, dois tipos de cultivo são usualmente utilizados: o cultivo monoxênico em ágar não nutriente e o cultivo axênico em PYG (*Peptone, Yeast Extract and Glucose*) (SCHUSTER, 2002).

A eficácia e a viabilidade da cultura de amostras clínicas e ambientais de *Acanthamoeba* em ágar não nutriente já foram descritas por muitos autores. Esse meio apresenta quantidades mínimas de nutrientes e essa condição é essencial para o isolamento de *Acanthamoeba*, principalmente de amostras ambientais, pois tende a inibir o crescimento de organismos indesejados, como fungos e outros protozoários de vida livre. Dessa forma, é comum o enriquecimento do meio com bactérias, usualmente *Escherichia coli* ou *Enterobacter aerogenes*, como forma de se obter um substrato alimentar para *Acanthamoeba*, estimulando seu crescimento em cultura. Os isolados em ágar podem ser facilmente mantidos por meio de repiques periódicos, além disso, cistos de *Acanthamoeba* podem se manter viáveis durante longos períodos de tempo nesse meio de cultura, desde que o mesmo seja armazenado de forma apropriada (mantido a baixas temperaturas e protegido da dessecação) (PAGE, 1988; SCHUSTER, 2002; KHAN, 2006).

A cultura do raspado de córnea em ágar não nutriente é o principal método utilizado para o diagnóstico laboratorial de ceratite por *Acanthamoeba* (WALOCHNIK et al, 2000a; SPANAKOS et al, 2006; ABE e KIMATA, 2010), e isolamentos a partir da biópsia da pele, do cérebro e do pulmão de pacientes com EAG, ou outras infecções sistêmicas causadas por *Acanthamoeba*, também já foram realizados nesse meio de cultura (VISVEVARA et al, 1983; BLOCH e SCHUSTER, 2005; BARETE et al, 2007). Da mesma forma, isolados provenientes de diversos tipos de amostras ambientais são capazes de se desenvolver nesse meio (SALAZAR et al, 1982; KILIC et al, 2004; MUNSON e PAGET, 2006). Além disso, todas as espécies de *Acanthamoeba*, independente do seu potencial patogênico, podem ser cultivadas em ágar não nutriente com *E.coli* (PAGE, 1988). Cabe destacar ainda, que Foronda (1979), ao comparar o crescimento de AVL em diferentes meios de cultura, relatou a eficácia do uso do meio ágar soja não nutriente. Devido ainda à viabilidade e ao baixo custo, desde então esse meio de cultura tem sido utilizado por muitos autores para o isolamento de *Acanthamoeba* (SILVA e ROSA; 2003; CARVALHO et al, 2009; COSTA et al, 2010).

Por outro lado, isolados de *Acanthamoeba* também podem ser obtidos e mantidos em laboratório em culturas axênicas, livres de bactérias e de qualquer outro microorganismo. Esse tipo de cultivo é realizado em meios enriquecidos com nutrientes essenciais para o desenvolvimento do organismo desejado, que no caso de *Acanthamoeba* geralmente são: Peptona, Extrato de Levedura e Glicose (PYG) (SCHUSTER, 2002). Para se obter um isolado axênico de *Acanthamoeba* a partir de um isolado monoxênico ou polixênico, o modo mais eficaz para a eliminação da microbiota associada consiste na adição de antibióticos ao meio. No entanto, determinadas doses de antibióticos podem ser tóxicas também para *Acanthamoeba* e muitos microorganismos, como fungos e bactérias, não são facilmente eliminados, o que dificulta a obtenção de culturas axênicas. Por isso, é comum a utilização de bactérias previamente inativadas pelo calor como substrato alimentar de *Acanthamoeba* em cultivos monoxênicos (SCHUSTER, 2002; KAO et al, 2012; MAGNET et al, 2012). Além disso, a axenização de um número considerável de isolados de *Acanthamoeba* é laboriosa e exige a adição de quantidades precisas de suplementos nutricionais ao meio, como soro bovino fetal e vitaminas (SCHUSTER, 2002; CHOMICZ et al, 2010; COSTA et al, 2010). Segundo Khan (2006), a axenização de determinadas culturas de *Acanthamoeba* não é possível de ser realizada devido à existência de bactérias viáveis no interior das amebas, que eventualmente são liberadas e promovem a contaminação do meio.

Embora a manutenção de *Acanthamoeba* em culturas monoxênicas seja mais rápida, eficaz e mais viável financeiramente do que a obtenção de culturas axênicas, experimentos bioquímicos e muitos testes de patogenicidade, por exemplo, só têm validade quando realizados com isolados puros de *Acanthamoeba*, o que explica a importância desse tipo de cultivo (SISSONS et al, 2004; DA ROCHA-AZEVEDO e COSTA e SILVA-FILHO, 2007; CHOMICZ et al, 2010).

2.2.7 Determinação do potencial patogênico

Sabe-se que o desenvolvimento de infecções causadas por *Acanthamoeba* não ocorre somente pelo simples contato com a mesma, uma vez que estudos demonstram o isolamento de *Acanthamoeba* em indivíduos assintomáticos e existem trabalhos que relatam a presença de anticorpos contra essas amebas em mais de 80% da população saudável (CERVA et al 1973; BADENOCH et al, 1988; CHAPPELL et al, 2001). Esses dados claramente sugerem que os mecanismos pelos quais *Acanthamoeba* é capaz de acessar um número limitado de hospedeiros susceptíveis, causando doença, envolvem uma série de fatores que podem estar relacionados direta ou indiretamente com a ameba ou com o hospedeiro e, ainda, com o ambiente (KHAN, 2006).

Dessa forma, estudos relacionados ao potencial patogênico de *Acanthamoeba* são realizados com o objetivo de determinar características biológicas que sejam intrínsecas de cepas patogênicas e que possam ser utilizadas como marcadores de patogenicidade. Neste contexto, parâmetros morfológicos e fisiológicos, além de vários modelos experimentais, já foram propostos e vêm sendo investigados há décadas (GRIFFIN, 1972; DE JONCKHEERE, 1980; DA ROCHA-AZEVEDO e COSTA e SILVA-FILHO, 2007).

Recentemente, técnicas moleculares também têm sido testadas como marcadores de patogenicidade e utilizadas na tentativa de compreender as relações filogenéticas entre as linhagens capazes de causar infecção e aquelas não patogênicas. No entanto, até os dados referentes ao sequenciamento genômico ainda são pouco esclarecedores frente à diversidade dos mecanismos envolvidos na patogenia de *Acanthamoeba* (HOWE et al, 1997; KHAN et al, 2002; LEDEE et al, 2009).

De um modo geral, os testes de patogenicidade podem ser realizados *in vivo* ou *in vitro*. A infecção experimental de animais não é uma técnica recente e informações

importantes sobre a virulência de cepas clínicas e ambientais de *Acanthamoeba* podem ser obtidas dessa forma, desde que seja utilizado um modelo adequado. Sendo assim, muitos animais já foram testados como modelo de ceratite amebiana, dentre eles: ratos (HE et al, 1990), coelhos (CÔTÉ et al, 1991), hamsters (CLARKE et al, 2005) e miniporcos (HE et al, 1992), sendo que vários métodos podem ser utilizados para induzir a infecção, como abrasão da córnea, aplicação de lentes de contato contaminadas com *Acanthamoeba* na córnea intacta ou lesionada, injeção intraestromal de *Acanthamoeba*, entre outros (VAN KLINK et al, 1993; CLARKE et al, 2005; REN e WU, 2010). Da mesma forma, alguns modelos experimentais de EAG também já foram propostos, e incluem: camundongos, macacos e até gafanhotos. Nesses casos, a infecção pode ser induzida mediante inoculação de trofozoítos por via intracraniana, intranasal, intra-abdominal, entre outras (CULBERTSON et al, 1959; MORTAZAVI et al, 2009, 2010).

No entanto, devido às dificuldades técnicas relacionadas ao desenvolvimento de estudos *in vivo*, muitos marcadores de patogenicidade têm sido testados *in vitro*. Dentre eles, se incluem: sobrevivência e taxa de crescimento em cultivo axênico; velocidade de encistamento/desencistamento; capacidade de adesão a substratos inertes e biológicos (DE JONCKHEERE, 1980; DA ROCHA-AZEVEDO e COSTA e SILVA-FILHO, 2007; OMAÑA-MOLINA et al, 2010); efeito citopático em diferentes tipos de culturas celulares (IM et al, 1999; WALOCHNIK et al, 2000a; ALSAM et al, 2003); atividade proteolítica diferenciada (KHAN et al, 2000; DA ROCHA-AZEVEDO e COSTA e SILVA-FILHO, 2007; CARVALHO et al, 2010); e capacidade de adaptação a condições ambientais adversas, como crescimento em altas temperaturas e altas osmolaridades (KHAN et al, 2002; LORENZO-MORALES et al, 2005b; ALVES et al, 2012).

Ao contrário da maioria desses testes, a análise do desenvolvimento de culturas de *Acanthamoeba* a temperatura e osmolaridade aumentadas não requer culturas axênicas. Além disso, é uma metodologia de fácil execução e menor custo, o que explica sua utilização por grande parte dos pesquisadores que buscam informações sobre o potencial patogênico de isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba*, inclusive no Brasil (CAUMO et al, 2009; CARLESSO et al, 2010; WINK et al, 2011).

Presume-se que haja correlação entre termotolerância e potencial patogênico, pois a temperatura média do corpo humano é de 37°C. Dessa forma, uma das condições essenciais para uma linhagem de *Acanthamoeba* sobreviver às condições existentes no organismo de um

hospedeiro e se desenvolver como parasita seria a capacidade de se manter viável a essa temperatura. Além disso, a resistência a temperaturas superiores a 37°C, como 40°C e 42°C, possibilitaria uma adaptação ainda maior para o desenvolvimento de processos infecciosos, pois permitiria à ameba sobreviver a episódios de febre, o que seria uma característica típica de cepas mais virulentas (GRIFFIN, 1972; DE JONCKHEERE, 1980; KILIC et al, 2004).

Em 2001, Khan et al (2001) descreveram pela primeira vez a osmotolerância como um fator de patogenicidade de *Acanthamoeba*. Segundo esse determinante, isolados patogênicos seriam capazes de se desenvolver a 1M de manitol, enquanto que o crescimento de isolados não patogênicos seria inibido pelos efeitos osmóticos de uma alta concentração de manitol no meio. Além disso, esse trabalho demonstrou também que os resultados obtidos com os ensaios de osmotolerância eram similares àqueles dos testes de efeito citopático, o que, segundo os autores, reforçava a validade da osmotolerância como um importante marcador de patogenicidade de *Acanthamoeba*.

Considerando os aspectos acima, a determinação do potencial patogênico de *Acanthamoeba* permite que diferentes linhagens sejam diferenciadas quanto à capacidade de causar infecção, e isso é importante, principalmente, quando se tratam de linhagens provenientes de amostras clínicas, já que é comprovadamente possível o isolamento de *Acanthamoeba* a partir de tecidos saudáveis do homem. Dessa forma, essa discriminação permitiria avaliar adequadamente os fatores de risco relacionados à presença de *Acanthamoeba* em diferentes tipos de ambientes e em diferentes tipos de amostras clínicas. Além disso, muitos marcadores de patogenicidade podem ser utilizados também para uma melhor compreensão dos processos biológicos envolvidos na fisiopatologia das doenças causadas por *Acanthamoeba*, o que é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a ocorrência de *Acanthamoeba* em amostras clínicas e ambientais em Vitória-ES, determinar a classificação morfológica e genotípica dos isolados obtidos e caracterizá-los quanto à patogenicidade.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar a presença de *Acanthamoeba* em lesões oculares de pacientes atendidos no HUCAM.
- Investigar a presença de *Acanthamoeba* em poeira, solo, piscina, água potável, água de inundação e água do mar na região metropolitana de Vitória-ES.
- Identificar o gênero dos isolados.
- Classificar os isolados por parâmetros morfológicos e por sequenciamento parcial do gene 18S rDNA.
- Avaliar o potencial patogênico dos isolados por meio de ensaios de termotolerância e osmotolerância.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta de amostras e isolamento de *Acanthamoeba*

4.1.1 Amostras clínicas

Foram coletadas amostras de córnea de 15 pacientes com suspeita de ceratite por *Acanthamoeba* atendidos no Setor de Oftalmologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) no período de março de 2010 a maio de 2012. Todos os pacientes foram informados sobre os procedimentos e aceitaram participar do estudo mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 1).

As amostras foram coletadas por meio de raspado de córnea com semeadura direta em placas de Petri contendo meio ágar soja (ANEXO 2) e por esgotamento do raspado em tubos tipo *Eppendorf*® (1,5 ml) contendo 200 µl de salina de Page (ANEXO 2).

No laboratório, as placas foram acrescidas de 200 µl de uma suspensão de *Escherichia coli*, seladas com filme plástico PVC e incubadas a 28°C em estufa microbiológica por até 30 dias (ANEXO 3). Para verificar a presença de cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba*, a leitura das culturas foi realizada diariamente. Durante as primeiras 48 horas, as placas foram examinadas em microscópio invertido (visualização através da placa de Petri). Do terceiro ao 30º dia de incubação, as culturas foram examinadas alternadamente em microscópio óptico (por meio de lâminas) e em microscópio invertido, em aumentos de 200x e 400x. As placas negativas foram descartadas após a última leitura. Os raspados de córnea esgotados em salina foram utilizados para o diagnóstico molecular (conforme descrito no item 4.3) (ANEXO 3).

Nos casos em que o paciente era usuário de lentes de contato, foi solicitada a entrega das mesmas. As lentes foram encaminhadas para o laboratório nos próprios estojos de armazenamento e foram utilizadas pinças e pipetas estéreis para a transferência das lentes e do líquido de armazenamento para as placas com meio ágar soja. Essas culturas também receberam a suspensão de *E. coli* e foram incubadas e examinadas da mesma forma que as culturas de raspado de córnea (ANEXO 3).

4.1.2 Amostras ambientais

Entre os meses de abril de 2010 e junho de 2011, foram coletadas 90 amostras provenientes dos seguintes ambientes:

- **Poeira:**

Amostras de poeira foram coletadas de três residências, denominadas R_1 , R_2 e R_3 (**Figura 5**). Cada ponto de coleta (janelas, portas, corrimão, escadas, piso, objetos, móveis, entre outros) foi considerado como uma amostra e escolhido de forma aleatória em cada uma das residências, totalizando dez amostras coletadas.

- **Solo:**

Amostras de solo foram coletadas de três locais diferentes, denominados A_1 , A_2 e A_3 (**Figura 5**). Cada ponto de coleta foi considerado como uma amostra e escolhido de forma aleatória em cada um dos locais, totalizando dez amostras coletadas.

- **Piscina:**

Foram coletadas amostras de dez piscinas, denominadas P_1 , P_2 , P_3 , P_4 , P_5 , P_6 , P_7 , P_8 , P_9 e P_{10} (**Figura 5**). De cada uma delas foram coletadas três amostras: uma de água, uma do sedimento da escada e uma amostra do sedimento da saída do filtro, totalizando 30 amostras coletadas.

- **Água potável**

Amostras de água potável foram coletadas de cinco residências, denominadas RA_1 , RA_2 , RA_3 , RA_4 e RA_5 (**Figura 5**). Cada ponto de coleta (torneira do banheiro, da cozinha, do tanque, entre outros) foi escolhido de forma aleatória em cada uma das residências, totalizando dez pontos de coleta. De cada ponto foram coletadas duas amostras: uma de água e uma do biofilme da saída de água da torneira, totalizando 20 amostras coletadas.

- **Inundação:**

Foram coletadas amostras de dez pontos de inundação, denominados I_1 , I_2 , I_3 , I_4 , I_5 , I_6 , I_7 , I_8 , I_9 e I_{10} (**Figura 5**). Cada ponto foi considerado como uma amostra e escolhido de forma aleatória durante os eventos de inundação, totalizando dez amostras coletadas.

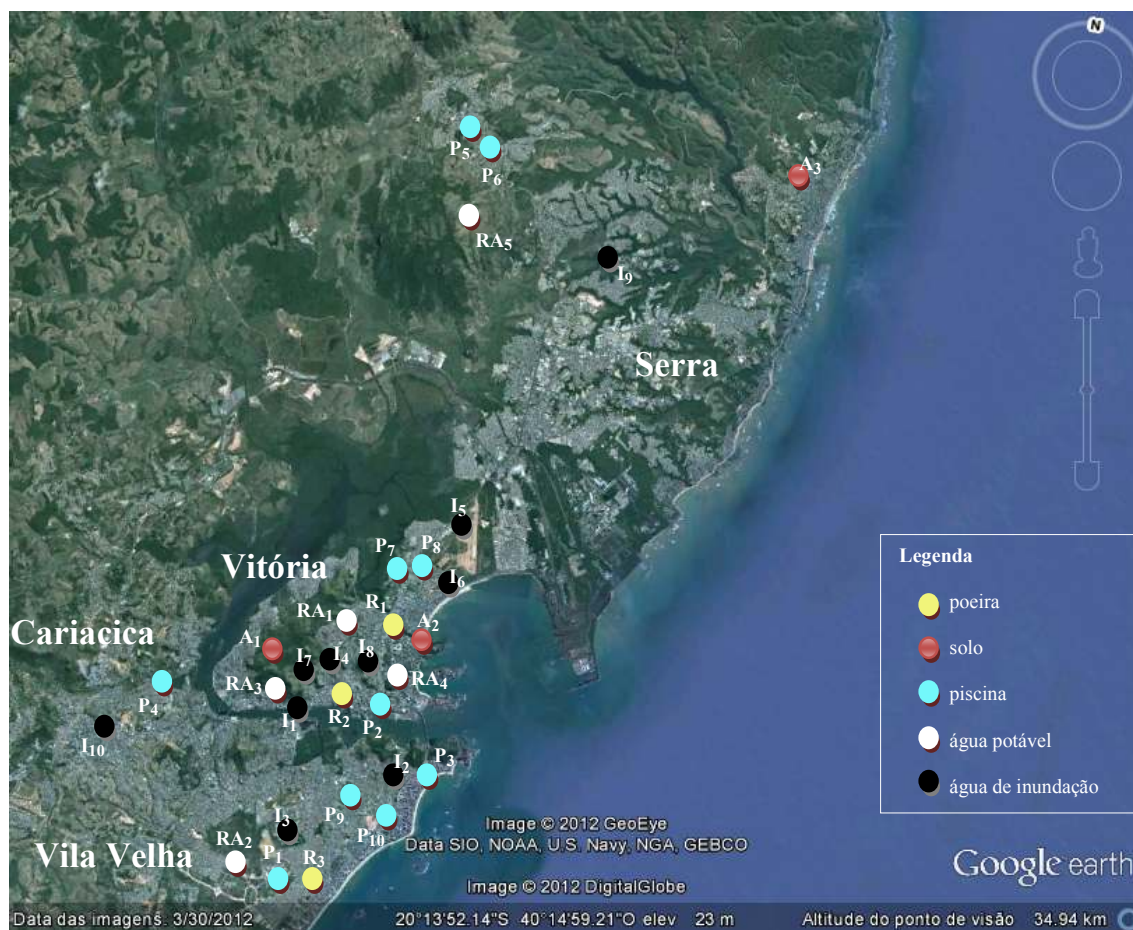


Figura 5: Pontos de coleta das amostras de poeira (R₁, R₂ e R₃), solo (A₁, A₂ e A₃), piscina (P₁, P₂, P₃, P₄, P₅, P₆, P₇, P₈, P₉ e P₁₀), água potável (RA₁, RA₂, RA₃, RA₄ e RA₅) e água de inundação (I₁, I₂, I₃, I₄, I₅, I₆, I₇, I₈, I₉ e I₁₀) em Vitória e região metropolitana (ES).

Fonte: Google Earth (2012).

▪ Mar:

Amostras de água do mar foram coletadas de dez pontos diferentes compreendidos entre a Praia da Curva da Jurema e a Praia de Camburi, em Vitória (ES) (**Figura 6**). Esses pontos fazem parte de um conjunto de 24 pontos estabelecidos pela prefeitura e distribuídos pela cidade de Vitória para a avaliação da balneabilidade das águas destinadas à recreação, como mostra o mapa de balneabilidade da Prefeitura de Vitória, disponível em: <<http://sistemas6.vitoria.es.gov.br/balneabilidade/balneabilidade.php>>. Acesso em: 30 mar. 2011. Cada ponto foi considerado como uma amostra, totalizando dez amostras coletadas.



Figura 6: Pontos de coleta (01, 02A, 04, 06, 08, 09, 10, 11, 12 e 13) das amostras de água do mar na Praia da Curva da Jurema (A), Praia do Canto (B) e Praia de Camburi (C) (Vitória-ES).

Fonte: Google Earth (2012).

Em cada ponto de coleta foi utilizado um *swab* seco, estéril e descartável para a coleta de poeira, solo, sedimento e biofilme ou um tubo estéril tipo *Falcon®* para a coleta de 50 ml de água. Todas as amostras coletadas foram semeadas em placas de Petri contendo meio ágar soja (ANEXO 3). Os *swabs* foram imediatamente esgotados no meio de cultura no local da coleta e as amostras de água foram encaminhadas para o laboratório, onde foram centrifugadas a 450 xg durante 10 min. Aproximadamente 2 ml do sedimento de centrifugação de cada tubo foram transferidos para duas placas com ágar soja. Somente as placas com o sedimento de centrifugação da água potável receberam a adição de 200 µl da suspensão de *E. coli*. Todas as placas foram seladas com filme plástico PVC e incubadas a 28°C em estufa microbiológica por até 15 dias (ANEXO 3). As culturas foram examinadas em microscópio óptico por meio de lâminas (aumentos de 200x e 400x) no quinto, décimo e 15º dia de incubação. Após a última leitura, as placas negativas para AVL foram descartadas.

4.1.3 Identificação de *Acanthamoeba* e cultivo dos isolados

Nas placas em que foi observado o crescimento de cistos e trofozoítos, o reconhecimento de amebas do gênero *Acanthamoeba* foi realizado de acordo com critérios morfológicos, com uma particular atenção para a parede dupla dos cistos (PUSSARD e PONS, 1977; PAGE, 1988).

Os isolados foram rotineiramente mantidos em culturas polixênicas em meio ágar soja. Quando confirmada a presença de *Acanthamoeba* nas culturas, foram feitos repiques para manter os isolados e para eliminar o excesso de contaminantes ambientais, como areia, terra, fungos, algas e outros protozoários. Com uma pipeta estéril, foram colocados em cada placa positiva aproximadamente 1,5 ml de salina de Page esterilizada. Com a mesma pipeta, a suspensão formada foi aspirada e devolvida para a placa várias vezes, com o objetivo de desprender do ágar os cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba*. A suspensão do isolado foi então transferida para uma nova placa de cultivo, que foi incubada nas mesmas condições que a amostra original durante cinco dias, quando foi analisada por meio de lâmina em microscópio óptico (aumentos de 200x e 400x) para a confirmação da presença de *Acanthamoeba*. Os isolados foram identificados de acordo com o ambiente de onde foram coletados ou com as iniciais dos pacientes e foram mantidos por meio de repiques realizados em intervalos de dois meses.

4.1.4 Clonagem

Com a finalidade de se obter culturas provenientes de uma única célula, foi realizada a clonagem de cistos e trofozoítos pelo método de diluição das amostras. Em caso de culturas com alto índice de contaminação, a técnica de diluição foi empregada primeiramente para tentar controlar o crescimento de contaminantes que pudessem dificultar o processo de purificação dos isolados. Por pipetagem, cistos e trofozoítos de cada isolado foram suspensos em 2 ml de salina de Page esterilizada. A suspensão foi coletada e transferida para tubo estéril, para a quantificação em câmara de Neubauer. A concentração das amebas foi então ajustada por diluição, de modo a se obter dez a 15 cistos ou trofozoítos em cada 10 µl da suspensão. Este volume foi distribuído em dez poços (10 µl/poço) de placa para cultura de células de 96 poços e observado em microscópio invertido (aumentos de 200x e 400x). Quando formas morfológicas típicas foram detectadas nos poços, a cada um deles foram adicionados 30 µl de salina de Page esterilizada. O volume total de cada poço foi transferido para uma área de meio ágar soja em placa de Petri, demarcada externamente com um círculo. Em cada área foram adicionados ainda 20 µl da suspensão de *E. coli*. A placa foi selada e incubada a 28°C por até dez dias. Diariamente as áreas da placa foram examinadas em microscópio invertido (aumentos de 200x e 400x) para detectar a presença de cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba*, bem como verificar o desenvolvimento de outros microorganismos. As regiões das áreas positivas que possuíam menos contaminantes foram

marcadas externamente com caneta, raspadas cuidadosamente com alça bacteriológica estéril e transferidas para uma nova placa de cultivo, que foi examinada diariamente para a conferência da eliminação dos contaminantes.

A clonagem dos isolados descontaminados consistiu em repetir o mesmo processo de diluição, com algumas modificações. Após a contagem em câmara de Neubauer, a diluição foi feita de forma a se obter um cisto ou um trofozoíto em cada 5 μ l da suspensão do isolado, que foi transferido para a placa com ágar somente quando confirmada, por microscopia, a diluição desejada. As áreas da placa foram examinadas durante dez dias com intervalos de 48 horas. As áreas onde foram constatadas amebas foram escolhidas ao acaso, transferidas para outras placas e clonadas mais duas vezes, para garantir a obtenção de clones, como descrito por Costa et al (2010). Os clones de terceira geração foram incubados até que se obtivesse um crescimento suficiente para a classificação morfológica (**ANEXO 3**). Para a manutenção dos isolados clonados foram feitos repiques a cada cinco meses. Todos os procedimentos realizados para o isolamento e clonagem de *Acanthamoeba* em ágar soja estão representados no fluxograma da **Figura 7**.

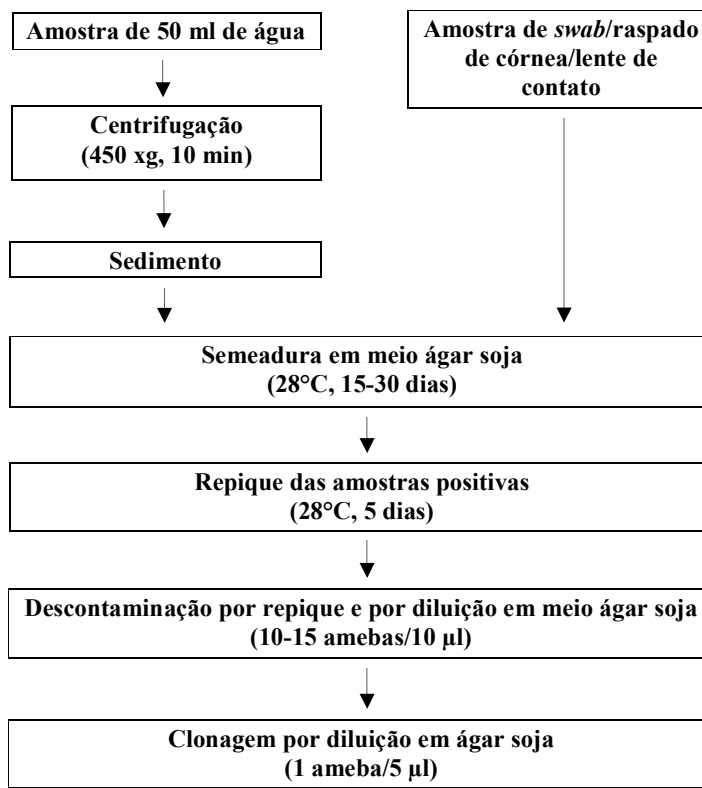


Figura 7: Fluxograma de procedimentos para isolamento e clonagem de *Acanthamoeba* em culturas de amostras clínicas e ambientais.

4.2 Classificação morfológica dos isolados clonados

Os isolados clonados foram submetidos à classificação morfológica proposta por Pussard e Pons (1977). Critérios como o diâmetro dos cistos e a forma do endocisto e do ectocisto foram utilizados para classificar os isolados nos grupos morfológicos I, II ou III. Os cistos foram analisados por microscopia óptica e a medida dos mesmos foi realizada utilizando ocular milimetrada, em aumento de 400x. Foram medidos 20 cistos de cada isolado para a obtenção dos valores médios e cálculo do desvio padrão.

4.3 Identificação molecular

4.3.1 Extração de DNA

Dois métodos de extração de DNA foram utilizados: o *kit* de extração *ChargeSwitch® gDNA Micro Tissue* (Invitrogen®) e uma técnica de lise alcalina, modificada de um protocolo proposto por Vianna et al (2009).

O *kit* foi utilizado para a extração de DNA das amostras clínicas destinadas ao diagnóstico molecular. Os tubos contendo as amostras de raspado de córnea foram centrifugados a 5000 xg durante 10 min e 150 µl do sobrenadante foram descartados. Os demais procedimentos seguiram as instruções do fabricante (**ANEXO 4**).

A técnica de lise alcalina modificada foi utilizada para a extração de DNA das culturas de amostras clonadas. As modificações consistiram em eliminar a etapa de tratamento com PVPP, descrita originalmente por Vianna et al (2009), e incluir uma etapa de tratamento com proteinase K. Trofozoítos em fase exponencial de crescimento foram recuperados da placa e lavados três vezes em salina de Page por centrifugação (450 xg durante 10 min). O sedimento foi suspenso em 1,5 ml de salina de Page e transferido para tubo tipo *Eppendorf®* de 1,5 ml. O tubo foi centrifugado a 6000 xg por 10 min e o sobrenadante foi descartado. Os demais procedimentos seguiram o protocolo descrito pelos autores (**ANEXO 5**).

4.3.2 PCR do gene 18S rDNA

A PCR foi realizada para: **a)** diagnóstico de ceratite amebiana em amostras de córnea, associada à semi-nested PCR (snPCR); **b)** confirmação do gênero *Acanthamoeba* nas culturas

clonadas; e c) obtenção de moldes de DNA para o sequenciamento e classificação genotípica dos isolados (**ANEXO 3**).

Na PCR foram utilizados os seguintes iniciadores (*primers*): JDP1 (*forward*: 5'GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA3') e JDP2 (*reverse*: 5'TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA3'). Esses *primers*, específicos para *Acanthamoeba*, foram utilizados por Schroeder et al (2001) e amplificam um fragmento do gene 18S rDNA denominado ASA.S1 (*Acanthamoeba Specific Amplimer S1*), com tamanho esperado em torno de 423 a 551pb. Para cada reação foram utilizados: tampão de reação 1X, 4 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (GE Healthcare®), 1,5 µg/µl de BSA, 0,5 µM de cada *primer* (Invitrogen®) e 0,6 U de Taq DNA polimerase *Platinum* (Invitrogen®). Para o diagnóstico de ceratite, foram utilizados 10 µl do produto de extração do *kit* em um volume final de 50 µl; para a confirmação do gênero nas amostras clonadas, foram utilizados 30 ng de DNA em um volume final de 15 µl; e para o sequenciamento, 30 ng de DNA em um volume final de 50 µl. A PCR foi realizada em um termociclador *Veriti® 96-well* (Applied Biosystems®), programado para uma desnaturação inicial a 94°C por 7 min, seguida de 25 ciclos a 94°C por 1 min, 60°C por 1 min, 72°C durante 2 min e uma extensão final a 72°C por 10 min.

A snPCR foi realizada por meio da técnica descrita por Dhivya et al (2007), com algumas modificações. Foram utilizados os *primers* A1 (*foward*: 5'AACGATGCCGACCAGCGATTA3') e JDP2 (*reverse*: 5'TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA3'), que amplificam uma região com tamanho esperado em torno de 120 a 160pb do fragmento ASA.S1. Cada reação foi realizada em volume de 18 µl contendo 2 µl do produto de amplificação da primeira PCR das amostras clínicas, tampão de reação 1X, 4 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (GE Healthcare®), 0,5 µM de cada *primer* (Invitrogen®) e 0,6 U de Taq DNA polimerase *Platinum* (Invitrogen®). O termociclador *Veriti® 96-well* (Applied Biosystems®) foi programado para uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida de 20 ciclos a 95°C por 45 seg, 62°C por 45 seg, 72°C durante 45 seg e uma extensão final a 72°C por 5 min.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% e corados com nitrato de prata. O gel foi visualizado em um fotodocumentador e registrado com máquina fotográfica. Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA *Ladder* de 100pb (Promega®).

4.4 Classificação genotípica

O sequenciamento do fragmento ASA.S1 do gene 18S rDNA foi utilizado para determinar os genótipos dos isolados. Os produtos da PCR foram submetidos à purificação de acordo com o protocolo do *kit GenElute® PCR Clean-Up* (Sigma-Aldrich®) (**ANEXO 6**). Em seguida, a marcagem do DNA para seu posterior sequenciamento foi realizada com o *kit BigDye® Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems®). Foi feita uma reação por *primer*, ou seja, duas reações para cada fragmento de DNA (*forward* e *reverse*), ocorrendo a partir das duas extremidades para gerar sequências consenso. A mistura de cada uma foi preparada da seguinte maneira: 2 µl de *Premix Ready Reaction*, 4 µl de tampão de sequenciamento 2,5X (1,5 µl do tampão *BigDye* e 1,5 µl de água ultra-pura esterilizada), 5,0 pmoles de cada *primer* correspondente - JDP1 ou JDP2 (Invitrogen®) - e 40 ng de DNA molde purificado, em um volume final de 20 µl. A reação foi realizada em um termociclador *Veriti® 96-well* (Applied Biosystems®), programado para uma desnaturação inicial a 94°C por 1 min, seguida de 45 ciclos a 94°C por 10 seg, 60°C por 7 seg e uma extensão final a 60°C por 3 min.

O DNA marcado foi então purificado da seguinte forma: foram adicionados ao volume amplificado 60 µl de isopropanol 75% e após homogeneização, a mistura foi deixada à temperatura ambiente por 20 min. A amostra foi centrifugada a 6000 xg durante 20 min e o isopropanol foi descartado. Ao volume restante foram adicionados 300 µl de etanol 70% e a amostra foi centrifugada mais uma vez a 6000 xg por 20 min, sendo o sobrenadante removido posteriormente. Os tubos foram então colocados abertos em estufa a 37°C.

Após a secagem, a cada tubo foram adicionados 10µl de formamida HI-DI. As amostras foram então colocadas em placas de sequenciamento e submetidas em termociclador a uma temperatura de 95°C por 5 min. O sequenciador *ABI 3130* (Applied Biosystems®) foi utilizado para a separação e detecção do DNA marcado.

As sequências foram analisadas e corrigidas com o programa *Staden Package* (STADEN et al, 2001) e alinhadas com a versão 5.0 do MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA et al, 2011). O programa MEGA versão 5.0 (TAMURA et al, 2011) também foi utilizado para: obtenção da composição nucleotídica e aminoácídica, cálculo das distâncias e posições nucleotídicas variáveis e para processar as análises filogenéticas das sequências de DNA.

As sequências nucleotídicas obtidas foram comparadas com as sequências do *GenBank* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) por meio do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>> Acesso em: 10 ago. 2011. A determinação dos genótipos foi realizada de acordo com a maior porcentagem de similaridade que as sequências obtidas apresentavam em relação às sequências disponíveis no *GenBank*.

4.5 Ensaios de patogenicidade nos isolados clonados

As culturas clonadas, mantidas em meio ágar soja com *E. coli*, foram submetidas aos testes de termotolerância (GRIFFIN, 1972) e de osmotolerância (KHAN et al, 2001), utilizados como marcadores de patogenicidade (ANEXO 3).

4.5.1 Termotolerância

Para a análise da tolerância às temperaturas de 28°C, 37°C e 42°C, trofozoítos de cultura em fase exponencial de crescimento foram recolhidos da placa em salina de Page e quantificados em câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada de modo a se obter 1×10^3 trofozoítos em cada 25 µl de suspensão. Este volume foi semeado em área central (demarcada externamente com um círculo de 1 cm de diâmetro) de placas de Petri contendo meio ágar soja e foi incubado a 28°C, 37°C e 42°C. O teste foi realizado em triplicata para cada temperatura. O crescimento das amebas foi determinado pela linha de expansão dos trofozoítos a partir da área central e foi avaliado qualitativamente. Os resultados foram representados por: (-), indicando ausência de crescimento, e (+), indicando crescimento a partir de 0,5 cm. As placas foram observadas diariamente em microscópio invertido (aumentos de 200x e 400x) até o décimo dia de incubação.

4.5.2 Osmotolerância

Para investigar o efeito da osmolaridade no crescimento de *Acanthamoeba*, aproximadamente 1×10^3 trofozoítos de cultura em fase exponencial de crescimento (contados em câmara de Neubauer e diluídos em 25µl de salina de Page) foram semeados em área central (1 cm de diâmetro) de placas de Petri contendo meio ágar soja acrescido de 0,1M, 0,5M e 1,0M de manitol. O teste foi realizado em triplicata para cada concentração de manitol

e as placas foram incubadas a 28°C. O crescimento das amebas foi determinado da mesma forma que nos ensaios de termotolerância, como descrito anteriormente.

5 RESULTADOS

5.1 Coleta de amostras e isolamento de *Acanthamoeba*

5.1.1 Amostras clínicas

Dos 15 pacientes com suspeita de ceratite amebiana, 11 eram usuários de lentes de contato, 14 apresentavam suspeita de ceratite amebiana unilateral e um paciente apresentava quadro clínico sugestivo de ceratite amebiana bilateral (**Tabela 1**). Foram diagnosticados quatro casos de ceratite por isolamento de *Acanthamoeba* em cultura (**Tabela 1**). Dentre os usuários de lentes de contato, foram obtidas as lentes do olho direito e do olho esquerdo de KPG, CMC, CFP e TMR, e foi obtida somente a lente do olho direito do paciente RNM.

Tabela 1: Resultado da cultura das amostras de raspado de córnea dos pacientes com suspeita de ceratite amebiana atendidos no Setor de Oftalmologia do HUCAM em Vitória (ES) no período de 2010-2012 com procedência e histórico de uso de lentes de contato.

PACIENTES	PROCEDÊNCIA	USUÁRIO DE LC ^b	RESULTADO DA CULTURA
KPG	Serra	S ^c	-
JRR	Domingos Martins	S	-
CMC	Cariacica	S	-
RSL	Vila Velha	S	-
JJD	Vila Velha	N ^d	-
CFP	Vitória	S	-
TMR	Vitória	S	-
FCM	Cariacica	N	-
CFD	Vitória	N	-
DCJ	Cariacica	S	-
MMM	Vitória	S	-
AAO	Vila Velha	N	+
ZCS	Vitória	S	+
JSR	Cariacica	S	+
RNM ^a	Cariacica	S	OD ^e : + OE ^f : -
TOTAL: 15		11	4 amostras positivas

^a RNM: paciente com suspeita de ceratite amebiana bilateral; ^b LC: lentes de contato;

^c S: sim; ^d N: não; ^e OD: olho direito; ^f OE: olho esquerdo.

As formas evolutivas de *Acanthamoeba* foram observadas em períodos que variaram de 24 horas a seis dias após o cultivo das amostras clínicas. Em todas as culturas positivas

foram detectados cistos que apresentavam parede dupla com endocisto poligonal e ectocisto ondulado e trofozoítos com vacúolo contrátil evidente e acantapódios típicos (**Figura 8**). Dentre os quatro isolados de *Acanthamoeba*, somente de AAO, ZCS e RNM foram obtidos clones, denominados AAO-1, ZCS-1 e RNM OD-1, respectivamente. O isolado JSR apresentou crescimento excessivo de fungos filamentosos, que não foi controlado por repique e nem por micromanipulação, tornando impossível a manutenção da cultura. O único isolado obtido a partir do cultivo das lentes de contato foi proveniente da lente do paciente RNM. Esse isolado também foi clonado e denominado RNM LD-1. No total, foram obtidos quatro isolados clonados de *Acanthamoeba*: AAO-1, ZCS-1, RNM OD-1 e RNM LD-1.

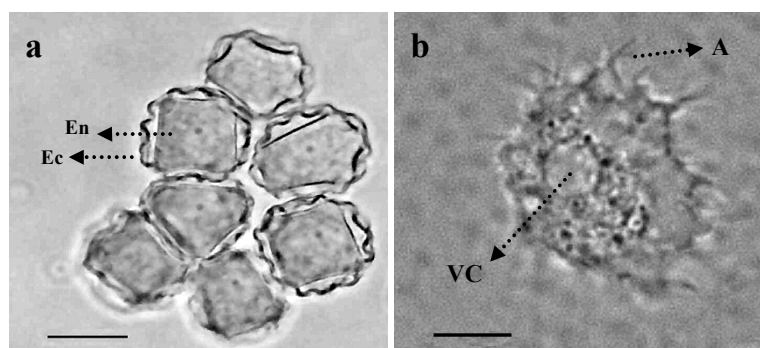


Figura 8: Cistos e trofozoíto de *Acanthamoeba* do isolado AAO-1 demonstrando aspectos morfológicos típicos do gênero: **(a)** cistos com parede dupla (En: endocisto poligonal; Ec: ectocisto ondulado); **(b)** trofozoíto com acantapódios típicos (A) e vacúolo contrátil evidente (VC). Barra: 10µm.

5.1.2 Amostras ambientais

A identificação morfológica do gênero *Acanthamoeba* nas culturas das amostras ambientais foi realizada pela presença de acantapódios nos trofozoítos e principalmente pela presença da parede dupla nos cistos. A observação dessas características foi realizada no primeiro dia de leitura (quinto dia de incubação) na maioria das culturas positivas. Somente em poucas delas a presença de *Acanthamoeba* só foi detectada no segundo ou no terceiro dia de leitura (décimo e 15º dia de incubação, respectivamente).

▪ Poeira:

Dentre as dez culturas de amostras de poeira analisadas, três (30%) foram positivas para *Acanthamoeba* (**Tabela 2**). Apesar das tentativas de descontaminação por micromanipulação, a proliferação de fungos foi excessiva e difícil de ser controlada em todas as culturas positivas.

Ainda assim, foram selecionados dois isolados para a clonagem (R_2P_1 e R_3P_2) e de cada um foram obtidos dois clones diferentes, totalizando quatro isolados clonados de poeira: R_2P_{1-1} , R_2P_{1-2} , R_3P_{2-1} e R_3P_{2-2} .

Tabela 2: Resultado da cultura de dez amostras de poeira coletadas em Vitória e região metropolitana (ES).

LOCAIS DE COLETA (POEIRA)	NÚMERO DE AMOSTRAS	IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	RESULTADO DA CULTURA
Residência 1 Vitória	4	R_1P_1	-
		R_1P_2	-
		R_1P_3	-
		R_1P_4	-
Residência 2 Vitória	2	R_2P_1	+
		R_2P_2	-
Residência 3 Vila Velha	4	R_3P_1	-
		R_3P_2	+
		R_3P_3	-
		R_3P_4	+
TOTAL: 3	10		3 amostras positivas

▪ Solo

Todas as dez (100%) culturas de amostras de solo analisadas foram positivas para *Acanthamoeba* (**Tabela 3**). Devido ao grande número de gêneros de AVL presentes nas culturas, a identificação morfológica de *Acanthamoeba* foi realizada exclusivamente com base nas características dos cistos. O excesso de contaminantes foi eliminado em todos os isolados e dois foram selecionados para a clonagem: A_1P_1 e A_2P_2 . De cada um foram obtidos dois clones, A_1P_{1-1} , A_1P_{1-2} , A_2P_{2-1} e A_2P_{2-2} , totalizando quatro isolados clonados de solo.

Tabela 3: Resultado da cultura de dez amostras de solo coletadas em Vitória e região metropolitana (ES).

LOCAIS DE COLETA (SOLO)	NÚMERO DE AMOSTRAS	IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	RESULTADO DA CULTURA
Campus UFES-Maruípe Vitória	3	A_1P_1	+
		A_1P_2	+
		A_1P_3	+
Margem do Canal de Camburi Vitória	4	A_2P_1	+
		A_2P_2	+
		A_2P_3	+
		A_2P_4	+
Jardim de residência Serra	3	A_3P_1	+
		A_3P_2	+
		A_3P_3	+
TOTAL: 3	10		10 amostras positivas

▪ Piscina

Das dez culturas de amostras de água de piscina submetidas à análise, em nenhuma houve a detecção de *Acanthamoeba*. Em contrapartida, dentre as culturas de amostras do sedimento do filtro e da escada, foi verificada a presença de *Acanthamoeba* em cinco (16,6%) delas (**Tabela 4**). Durante os procedimentos de repique e descontaminação, o isolado P₂P₂ não se desenvolveu como esperado, o que impossibilitou a sua manutenção. Nos outros quatro isolados a descontaminação foi realizada e P₁P₂ e P₄P₂ foram selecionados para a obtenção de clones. De cada um foram obtidos dois clones, totalizando quatro isolados clonados de piscina: P₁P₂-1, P₁P₂-2, P₄P₂-1 e P₄P₂-2.

Tabela 4: Resultado da cultura de 30 amostras de piscina (água, sedimento do filtro e da escada) coletadas em Vitória e região metropolitana (ES).

LOCAIS DE COLETA (PISCINA)	NÚMERO DE AMOSTRAS	IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	TIPO DE AMOSTRA	RESULTADO DA CULTURA
Piscina 1 Vila Velha	3	P ₁ P ₁	água	-
		P ₁ P ₂	escada	+
		P ₁ P ₃	filtro	-
Piscina 2 Vitória	3	P ₂ P ₁	água	-
		P ₂ P ₂ ^a	filtro	+
		P ₂ P ₃	escada	+
Piscina 3 Vila Velha	3	P ₃ P ₁	água	-
		P ₃ P ₂	filtro	-
		P ₃ P ₃	escada	-
Piscina 4 Cariacica	3	P ₄ P ₁	água	-
		P ₄ P ₂	filtro	+
		P ₄ P ₃	escada	-
Piscina 5 Serra	3	P ₅ P ₁	água	-
		P ₅ P ₂	filtro	-
		P ₅ P ₃	escada	-
Piscina 6 Serra	3	P ₆ P ₁	água	-
		P ₆ P ₂	escada	-
		P ₆ P ₃	filtro	-
Piscina 7 Vitória	3	P ₇ P ₁	água	-
		P ₇ P ₂	escada	-
		P ₇ P ₃	filtro	-
Piscina 8 Vitória	3	P ₈ P ₁	água	-
		P ₈ P ₂	escada	-
		P ₈ P ₃	filtro	+
Piscina 9 Vila Velha	3	P ₉ P ₁	água	-
		P ₉ P ₂	filtro	-
		P ₉ P ₃	escada	-
Piscina 10 Vila Velha	3	P ₁₀ P ₁	água	-
		P ₁₀ P ₂	escada	-
		P ₁₀ P ₃	filtro	-
TOTAL: 10	30		3	5 amostras positivas

^a Isolado não mantido.

▪ Água potável

Das dez culturas de amostras de água potável analisadas, em nenhuma foi observada a presença de *Acanthamoeba*. Em contrapartida, dentre as dez culturas de amostras de torneira analisadas, em duas foi detectada a presença de *Acanthamoeba*, totalizando 10% de culturas positivas (**Tabela 5**). Em ambos isolados a contaminação foi facilmente eliminada por meio de repiques sucessivos. De cada isolado foram obtidos dois clones (RA₁P₂-1, RA₁P₂-2, RA₃P₂-1 e RA₃P₂-2), obtendo-se assim um total de quatro clones de torneira.

Tabela 5: Resultado da cultura de 20 amostras de água potável (água e biofilme da torneira) coletadas em Vitória e região metropolitana (ES).

LOCAIS DE COLETA (ÁGUA POTÁVEL)	NÚMERO DE AMOSTRAS	IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	TIPO DE AMOSTRA	RESULTADO DA CULTURA
Residência 1 Vitória	4	RA ₁ P ₁	água	-
		RA ₁ P ₂	torneira	+
		RA ₁ P ₃	água	-
		RA ₁ P ₄	torneira	-
Residência 2 Vila Velha	2	RA ₂ P ₁	água	-
		RA ₂ P ₂	torneira	-
Residência 3 Vitória	6	RA ₃ P ₁	água	-
		RA ₃ P ₂	torneira	+
		RA ₃ P ₃	água	-
		RA ₃ P ₄	torneira	-
		RA ₃ P ₅	água	-
		RA ₃ P ₆	torneira	-
Residência 4 Vitória	2	RA ₄ P ₁	água	-
		RA ₄ P ₂	torneira	-
Residência 5 Serra	6	RA ₅ P ₁	água	-
		RA ₅ P ₂	torneira	-
		RA ₅ P ₃	água	-
		RA ₅ P ₄	torneira	-
		RA ₅ P ₅	água	-
		RA ₅ P ₆	torneira	-
TOTAL: 5	20		2	2 amostras positivas

▪ Inundação

Todas as dez (100%) culturas de amostras de água de inundação analisadas foram positivas para *Acanthamoeba* (**Tabela 6**). Fungos, bactérias, algas e outros protozoários foram detectados de forma abundante em todas as culturas, o que dificultou os procedimentos de identificação de *Acanthamoeba*, realizada principalmente pela observação das características morfológicas dos cistos. Os procedimentos de micromanipulação foram exaustivamente repetidos, até que os contaminantes em excesso fossem eliminados. Todos os isolados foram

mantidos e I1 e I2 foram escolhidos para a obtenção dos clones I1-1, I1-2, I2-1 e I2-2, totalizando quatro isolados clonados de água de inundação.

Tabela 6: Resultado da cultura de dez amostras de água de inundação coletadas em Vitória e região metropolitana (ES).

LOCAIS DE COLETA (ÁGUA DE INUNDAÇÃO)	NÚMERO DE AMOSTRAS	IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	RESULTADO DA CULTURA
Ponto 1 Vitória	1	I1	+
Ponto 2 Vila Velha	1	I2	+
Ponto 3 Vila Velha	1	I3	+
Ponto 4 Vitória	1	I4	+
Ponto 5 Vitória	1	I5	+
Ponto 6 Vitória	1	I6	+
Ponto 7 Vitória	1	I7	+
Ponto 8 Vitória	1	I8	+
Ponto 9 Serra	1	I9	+
Ponto 10 Cariacica	1	I10	+
TOTAL: 10	10		10 amostras positivas

▪ Mar

Dentre as dez culturas de amostras de água do mar analisadas, três (30%) foram positivas para *Acanthamoeba* (**Tabela 7**). Devido ao grande número de gêneros de AVL presentes nas culturas, a identificação morfológica de *Acanthamoeba* foi realizada exclusivamente com base nas características dos cistos. Em todos os isolados o excesso de contaminantes fúngicos não foi controlado por micromanipulação, tornando-se a maior dificuldade encontrada para a manutenção dos mesmos e obtenção de clones. Sendo assim, o isolado M11 não foi mantido e foram obtidos dois clones de M9 (M9-1 e M9-2) e dois clones de M10 (M10-1 e M10-2), totalizando quatro clones provenientes de água do mar.

Tabela 7: Resultado da cultura de dez amostras de água do mar coletadas em Vitória (ES).

LOCAIS DE COLETA (ÁGUA DO MAR)	NÚMERO DE AMOSTRAS	IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	RESULTADO DA CULTURA
Ponto 01 Praia de Camburi	1	M1	-
Ponto 02A Praia de Camburi	1	M2A	-
Ponto 04 Praia de Camburi	1	M4	-
Ponto 06 Praia de Camburi	1	M6	-
Ponto 08 Praia de Camburi	1	M8	-
Ponto 09 Praia de Camburi	1	M9	+
Ponto 10 Praia do Canto	1	M10	+
Ponto 11 Praia do Canto	1	M11 ^a	+
Ponto 12 Praia da Curva da Jurema	1	M12	-
Ponto 13 Praia da Curva da Jurema	1	M13	-
TOTAL: 10	10		3 amostras positivas

^a Isolado não mantido.

Das 115 amostras cultivadas em ágar soja (90 amostras ambientais, 16 amostras clínicas e nove amostras de lentes de contato), 38 foram positivas para *Acanthamoeba* (33 ambientais, quatro clínicas e uma de lente de contato). Das 38 culturas de amostras positivas, 35 foram mantidas.

Foram obtidos clones de 16 isolados: de três isolados clínicos, do isolado da lente de contato e de 12 isolados ambientais. Dos três isolados clínicos e do isolado da lente de contato, foram obtidos quatro clones, cada um proveniente de um isolado. Dos 12 isolados ambientais, foram obtidos 24 clones (dois clones por isolado). Os 28 isolados clonados de *Acanthamoeba* foram então submetidos à classificação morfológica, à identificação molecular, à classificação genotípica e aos ensaios de patogenicidade.

5.2 Classificação morfológica dos isolados clonados

De acordo com os critérios estabelecidos por Pussard e Pons (1977), os isolados foram incluídos nos grupos morfológicos I e II. O tamanho médio dos cistos e o desvio padrão obtidos de cada isolado corresponderam à variação dada para os grupos morfológicos, bem como o formato do endocisto e do ectocisto da maioria dos isolados clonados. Somente o

isolado RA₃P₂-2 não foi classificado morfológicamente. Neste caso, características típicas de um único grupo morfológico não puderam ser determinadas com segurança, o que dificultou a classificação precisa do isolado no grupo morfológico II ou III (**Figura 9-a e Tabela 8**). O isolado A₁P₁-2 foi classificado como pertencente ao grupo morfológico I (**Figura 9-b e Tabela 8**) e os 26 isolados restantes apresentaram características típicas do grupo morfológico II (**Figura 9-c, d, e, f e Tabela 8**). Foi comumente observado que cistos pertencentes ao mesmo isolado clonado apresentavam variações morfológicas, principalmente no número de braços do endocisto (**Figura 9-d, e, f**).

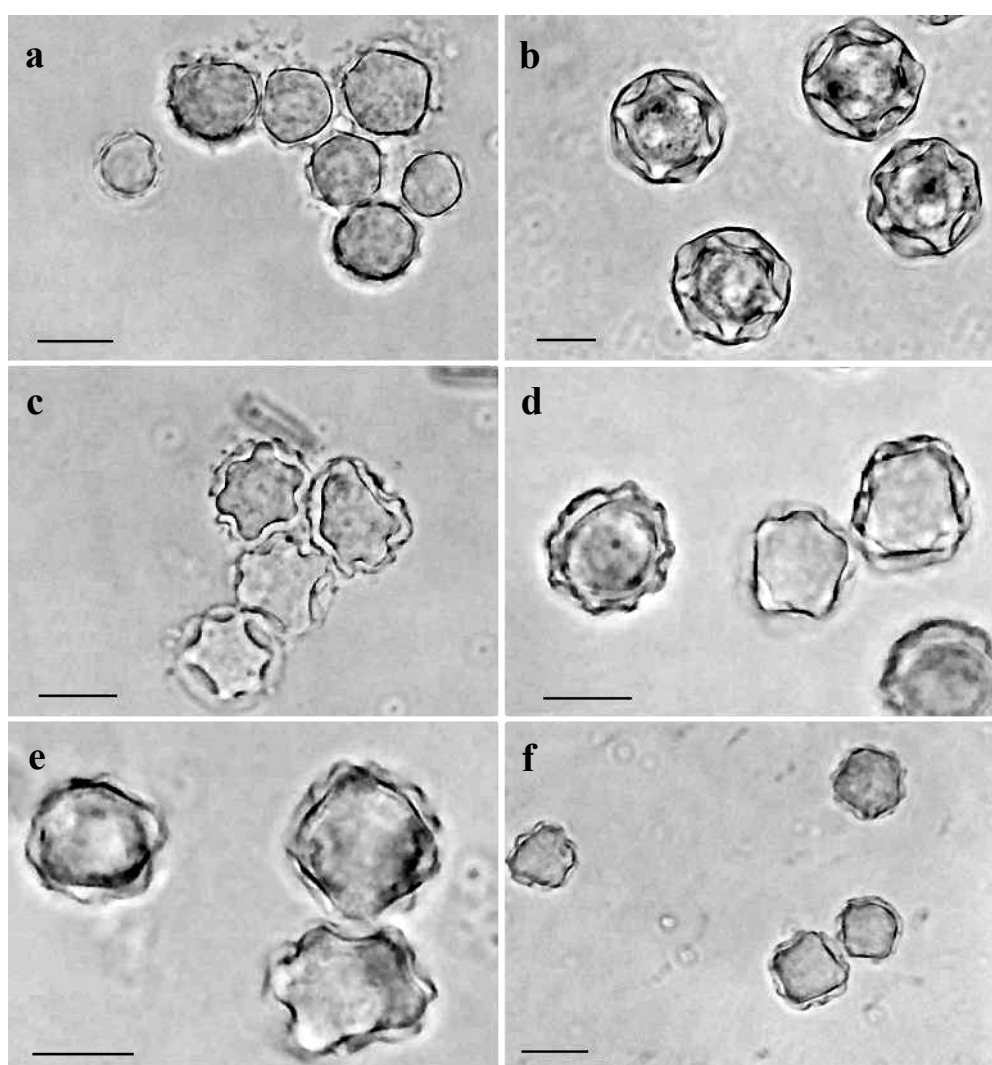


Figura 9: Cistos de isolados clonados de *Acanthamoeba* demonstrando características típicas dos grupos de Pussard e Pons (1977) e variações morfológicas entre cistos pertencentes ao mesmo isolado clonado. (a) isolado RA₃P₂-2 demonstrando características dos grupos II e III (endocisto oval e ectocisto ondulado); (b) isolado A₁P₁-2 demonstrando características do grupo I (endocisto estrelado e ectocisto liso); (c) (d) (e) (f) isolados I2-1, AAO-1, A₂P₂-2 e M9-1, respectivamente, demonstrando características do grupo II (endocisto poliédrico e ectocisto ondulado). Barra: 10µm.

Tabela 8: Classificação morfológica de isolados clonados de *Acanthamoeba* provenientes de amostras clínicas e ambientais e aspectos morfológicos dos cistos.

ISOLADOS	ORIGEM	MÉDIA DO DIÂMETRO DOS CISTOS ^a (µm ± DP ^b)	FORMATO DO ENDOCISTO	FORMATO DO ECTOCISTO	GRUPO MORFOLÓGICO ^c
AAO-1	raspado de córnea	13,8 ± 1,2	poliédrico	ondulado	II
ZCS-1		11,7 ± 1,0	poliédrico	ondulado	II
RNM OD-1		11,7 ± 0,8	poliédrico	ondulado	II
RNM LD-1	lente de contato	12,2 ± 0,7	poliédrico	ondulado	II
R ₂ P ₁ -1	poeira	10,3 ± 0,8	poliédrico	ondulado	II
R ₂ P ₁ -2		10,7 ± 0,9	poliédrico	ondulado	II
R ₃ P ₂ -1		11,5 ± 0,8	poliédrico	ondulado	II
R ₃ P ₂ -2		11,4 ± 0,9	poliédrico	ondulado	II
A ₁ P ₁ -1	solo	10,7 ± 1,0	poliédrico	ondulado	II
A ₁ P ₁ -2		19,0 ± 1,1	estrelado	liso	I
A ₂ P ₂ -1		13,2 ± 1,4	poliédrico	ondulado	II
A ₂ P ₂ -2		13,9 ± 1,0	poliédrico	ondulado	II
P ₁ P ₂ -1	piscina	14,0 ± 1,0	poliédrico	ondulado	II
P ₁ P ₂ -2		13,8 ± 1,0	poliédrico	ondulado	II
P ₄ P ₂ -1		10,2 + 1,3	poliédrico	ondulado	II
P ₄ P ₂ -2		10,6 + 0,7	poliédrico	ondulado	II
M9-1	mar	11,5 + 1,4	poliédrico	ondulado	II
M9-2		11,0 + 0,8	poliédrico	ondulado	II
M10-1		13,3 + 1,2	poliédrico	ondulado	II
M10-2		13,5 + 1,0	poliédrico	ondulado	II
RA ₁ P ₂ -1	torneira	11,4 + 0,7	poliédrico	ondulado	II
RA ₁ P ₂ -2		11,6 + 1,0	poliédrico	ondulado	II
RA ₃ P ₂ -1		11,6 + 0,7	poliédrico	ondulado	II
RA ₃ P ₂ -2		12,4 + 1,4	oval	ondulado	ND ^d
I1-1	inundação	12,6 + 1,0	poliédrico	ondulado	II
I1-2		12,3 + 0,9	poliédrico	ondulado	II
I2-1		13,8 + 1,5	poliédrico	ondulado	II
I2-2		12,9 + 1,3	poliédrico	ondulado	II
TOTAL: 28					1 isolado tipo I 1 isolado ND 26 isolados tipo II

^a Foram medidos 20 cistos de cada isolado; ^b DP: Desvio Padrão; ^c Classificação morfológica proposta por Pussard e Pons (1977); ^d ND: não determinado.

5.3 Identificação molecular

5.3.1 Diagnóstico molecular das amostras clínicas

A PCR e a snPCR confirmaram a suspeita clínica de ceratite amebiana em oito pacientes, sendo que foram obtidas amostras para o diagnóstico molecular de somente dez dos

15 pacientes atendidos no HUCAM (**Tabela 9**). O fragmento esperado da PCR, de aproximadamente 500pb, mostrou sinal nítido de amplificação para o paciente ZCS, sinais fracos ou muito difíceis de serem visualizados para CFD, DCJ, MMM, AAO, JRS e RNM e nenhuma amplificação para CFP, TMR e FCM (**Figura 10**). A amplificação dos produtos de PCR pela snPCR gerou fragmentos bem definidos de aproximadamente 150pb para FCM, CFD, DCJ, MMM, AAO, ZCS, JRS e RNM, confirmando o diagnóstico molecular desses casos suspeitos (**Figura 11**). Dentre os oito pacientes que apresentaram diagnóstico molecular positivo, somente de quatro (AAO, ZCS, JSR e RNM) se obteve o isolamento em cultura e a identificação morfológica de *Acanthamoeba* (**Tabela 9**). As culturas dos pacientes FCM, CFD, DCJ e MMM não se desenvolveram e o diagnóstico só foi obtido por meio das análises moleculares (**Tabela 9**).

Tabela 9: Resultado da cultura, da PCR e da snPCR das amostras de raspado de córnea dos pacientes com suspeita de ceratite amebiana atendidos no Setor de Oftalmologia do HUCAM em Vitória (ES) no período de 2010-2012.

PACIENTES	RESULTADO DA CULTURA	RESULTADO DA PCR	RESULTADO DA snPCR
KPG	-	NR ^d	NR
JRR	-	NR	NR
CMC	-	NR	NR
RSL	-	NR	NR
JJD	-	NR	NR
CFP	-	-	-
TMR	-	-	-
FCM	-	-	+
CFD	-	+	+
DCJ	-	+	+
MMM	-	+	+
AAO	+	+	+
ZCS	+	+	+
JSR	+	+	+
RNM ^a	OD ^b : + OE ^c : -	OD: + OE: -	OD: + OE: -
TOTAL: 15	4 amostras positivas	7 amostras positivas	8 amostras positivas

^a RNM: paciente com suspeita de ceratite amebiana bilateral; ^b OD: olho direito;

^c OE: olho esquerdo; ^d NR: não realizada.

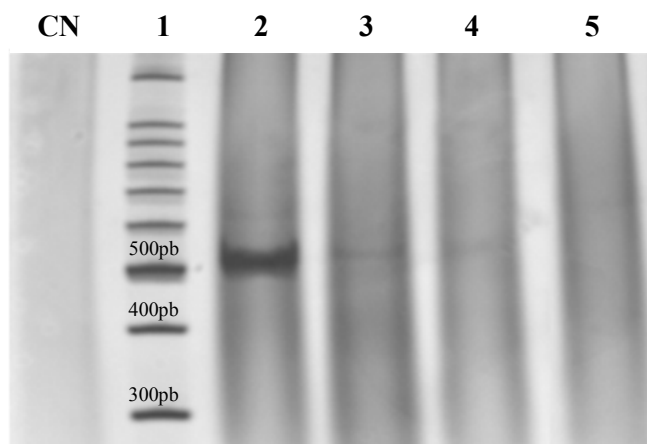


Figura 10: Resultado da amplificação por PCR do gene 18S rDNA das amostras de raspado de córnea esgotadas em salina de Page de quatro pacientes com suspeita de ceratite amebiana. O produto esperado, de tamanho entre 423 e 551pb, foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% e visualizado por coloração com nitrato de prata. **CN:** controle negativo; **1:** marcador 100pb; **2:** paciente ZCS; **3:** paciente JSR; **4:** paciente AAO; **5:** paciente TMR.

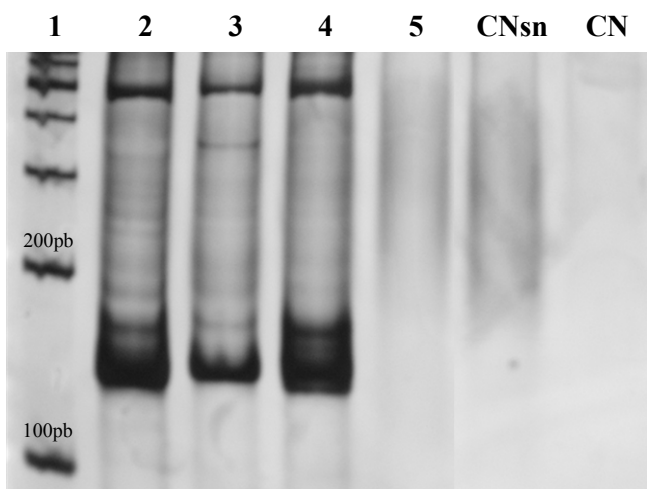


Figura 11: Resultado da amplificação dos produtos de PCR pela snPCR das amostras de raspado de córnea esgotadas em salina de Page de quatro pacientes com suspeita de ceratite amebiana. O produto esperado, de tamanho entre 120 e 160pb, foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% e visualizado por coloração com nitrato de prata. **1:** marcador 100pb; **2:** paciente ZCS; **3:** paciente JSR; **4:** paciente AAO; **5:** paciente TMR; **CNsn:** controle negativo da snPCR; **CN:** controle negativo da PCR submetido à snPCR.

5.3.2 Confirmação do gênero *Acanthamoeba* nas amostras clonadas

Os perfis de amplificação obtidos nos 28 isolados foram compatíveis com o esperado para o gênero *Acanthamoeba*. Os clones apresentaram fragmentos de amplificação que variaram de aproximadamente 450 a 500pb, como mostram as **Figuras 12 e 13**. O isolado classificado como pertencente ao grupo morfológico I (A_1P_1 -2) apresentou fragmento com tamanho diferente daqueles encontrados na maioria dos isolados (**Figura 12-4**). Da mesma forma, o único isolado que não foi classificado morfológicamente (RA_3P_2 -2) também apresentou uma variação evidente no tamanho do fragmento de amplificação (**Figura 13-3**).

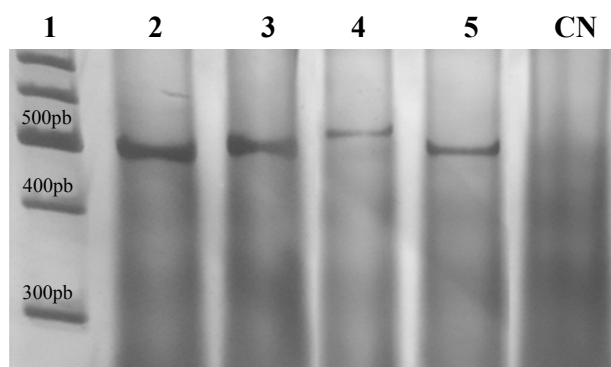


Figura 12: Resultado da amplificação por PCR do gene 18S rDNA de isolados clonados de *Acanthamoeba* provenientes de amostras ambientais. O produto esperado, de tamanho entre 423 e 551pb, foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% e visualizado por coloração com nitrato de prata. **1:** marcador 100pb; **2:** isolado P_1P_2 -1 (piscina); **3:** isolado P_4P_2 -1 (piscina); **4:** isolado A_1P_1 -2 (solo); **5:** isolado A_2P_2 -1 (solo); **CN:** controle negativo.

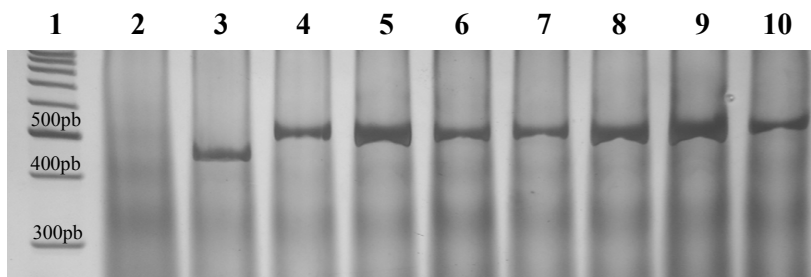


Figura 13: Resultado da amplificação por PCR do gene 18S rDNA de isolados clonados de *Acanthamoeba* provenientes de amostras ambientais. O produto esperado, de tamanho entre 423 e 551pb, foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% e visualizado por coloração com nitrato de prata. **1:** marcador 100pb; **2:** controle negativo; **3:** isolado RA_3P_2 -2 (água potável); **4:** isolado RA_1P_2 -1 (água potável); **5:** isolado R_2P_1 -1 (poeira); **6:** isolado R_3P_2 -1 (poeira); **7:** isolado M9-1 (mar); **8:** isolado M10-2 (mar); **9:** isolado I1-1 (inundação); **10:** isolado I2-1 (inundação).

5.4 Classificação genotípica

Dentre as 33 amostras (28 isolados clonados e cinco amostras clínicas que não foram isoladas ou mantidas em cultura) submetidas ao sequenciamento, somente as sequências de 19 isolados clonados (15 isolados ambientais, três clínicos e o isolado da lente de contato) puderam ser determinadas (**ANEXOS 7 e 8**). O sequenciamento das outras 14 amostras (nove isolados ambientais e cinco amostras clínicas) não foi realizado pois o enfraquecimento dos sinais em alguns trechos do eletroferograma impossibilitou a determinação precisa das sequências nucleotídicas das mesmas.

A comparação das sequências obtidas com as sequências nucleotídicas disponíveis no *GenBank* revelaram uma porcentagem de similaridade maior ou igual a 97% para a classificação genotípica dos isolados. Dessa forma, todos os isolados clínicos, o isolado obtido a partir da lente de contato e 12 isolados ambientais foram classificados como pertencentes ao genótipo T4 (**Tabela 10**). Dois isolados ambientais foram classificados como T11 e um isolado ambiental foi classificado como pertencente ao genótipo T1 (**Tabela 10**). A comparação das sequências permitiu também a identificação específica de *Acanthamoeba* de oito isolados (seis isolados ambientais e dois isolados clínicos) (**Tabela 11**). A identificação das espécies dos demais isolados (nove isolados ambientais, um clínico e o isolado da lente de contato) não foi realizada, pois as sequências dos mesmos apresentaram máxima similaridade com mais de uma espécie de *Acanthamoeba* (**Tabela 11**).

Tabela 10: Classificação genotípica dos isolados clonados de *Acanthamoeba* provenientes de amostras clínicas e ambientais e a porcentagem de similaridade obtida com as cepas de referência depositadas no *GenBank*.

ISOLADOS	ORIGEM	GENÓTIPO ^a	% DE SIMILARIDADE	NÚMERO DE ACESSO AO <i>GENBANK</i>
AAO-1	raspado de córnea	T4	99%	AY694138.1
ZCS-1		T4	99%	FJ042640.1
RNM OD-1	lente de contato	T4	99%	EU168081.2
RNM LD-1		T4	99%	EU168081.2
R ₂ P ₁ -1	poeira	T1	99%	DQ339096.1
R ₃ P ₂ -1		T4	99%	AB525819.1
R ₃ P ₂ -2		T4	99%	EU377583.1
A ₂ P ₂ -1	solo	T4	99%	HQ007038.1
A ₂ P ₂ -2		T4	100%	HQ007038.1
P ₁ P ₂ -2	piscina	T11	99%	JQ408992.1
P ₄ P ₂ -1		T11	98%	AF333608.1
M9-2	mar	T4	100%	AB525819.1
M10-1		T4	100%	AY03019.1
M10-2		T4	100%	AY03019.1
RA ₁ P ₂ -2	torneira	T4	99%	AY694138.1
I1-1	inundação	T4	99%	AY694143.1
I1-2		T4	97%	AY694143.1
I2-1		T4	99%	AY694138.1
I2-2		T4	99%	AY694138.1
TOTAL: 19		1 isolado T1 2 isolados T11 16 isolados T4		

^a Classificação genotípica proposta por Stothard et al (1998).

Tabela 11: Identificação das espécies de *Acanthamoeba* dos isolados clonados provenientes de amostras clínicas e ambientais e a porcentagem de similaridade obtida com as cepas de referência depositadas no *GenBank*.

ISOLADOS ^a	ESPÉCIE	% DE SIMILARIDADE	NÚMERO DE ACESSO AO GENBANK
AAO-1	<i>A. castellanii</i>	99%	UO7401.1
ZCS-1	<i>A. polyphaga</i>	99%	AY026243.1
RNM OD-1	<i>A. hatchetti</i>	99%	AF260722.1
	<i>A. polyphaga</i>		GU596996.1
RNM LD-1	<i>A. hatchetti</i>	99%	AF260722.1
	<i>A. polyphaga</i>		AF019061.1
R ₂ P ₁ -1	<i>A. castellanii</i>	99%	UO7400.1
	<i>A. healyi</i>		AF019070.1
R ₃ P ₂ -1	<i>A. quina</i>	99%	AY703023.1
	<i>A. polyphaga</i>		AF260725.1
	<i>A. palestinensis</i>		AF260719.1
	<i>A. castellanii</i>		UO7413.1
R ₃ P ₂ -2	<i>A. quina</i>	99%	AY703023.1
	<i>A. polyphaga</i>		AF260725.1
	<i>A. palestinensis</i>		AF260719.1
	<i>A. castellanii</i>		UO7413.1
A ₂ P ₂ -1	<i>A. castellanii</i>	99%	HQ007038.8
	<i>A. culbertsoni</i>		
	<i>A. hatchetti</i>		
A ₂ P ₂ -2	<i>A. castellanii</i>	100%	HQ007038.1
P ₁ P ₂ -2	<i>A. hatchetti</i>	99%	JF508857.1
P ₄ P ₂ -1	<i>A. castellanii</i>	98%	UO7401.1
	<i>A. polyphaga</i>		FJ195368
M9-2	<i>A. quina</i>	99%	AY703023.1
	<i>A. palestinensis</i>		AF260719.1
	<i>A. polyphaga</i>		AF260725.1
	<i>A. castellanii</i>		EF176006.1
M10-1	<i>A. culbertsoni</i>	100%	AF019057.1
M10-2	<i>A. culbertsoni</i>	100%	AF019057.1
RA ₁ P ₂ -2	<i>A. castellanii</i>	99%	UO7401.1
I1-1	<i>A. castellanii</i>	99%	GU001160.1
	<i>A. hatchetti</i>		AF260722.1
	<i>A. polyphaga</i>		AF019061.1
	<i>A. rhyssodes</i>		UO7406.1
I1-2	<i>A. polyphaga</i>	97%	AY026243.1
	<i>A. castellanii</i>		EF554328.1
I2-1	<i>A. castellanii</i>	98%	UO7401.1
	<i>A. quina</i>		AY703023.1
	<i>A. polyphaga</i>		AY173010.1
I2-2	<i>A. castellanii</i>	98%	UO7401.1

^a AAO-1, ZCS-1 e RNM OD-1: isolados clínicos de pacientes com ceratite amebiana; RNM LD-1: isolado da lente de contato do paciente RNM OD-1; R₂P₁-1, R₃P₂-1 e R₃P₂-2: isolados de poeira; A₂P₂-1 e A₂P₂-2: isolados de solo; P₁P₂-2 e P₄P₂-1: isolados de piscina; M9-2, M10-1 e M10-2: isolados de mar; RA₁P₂-2: isolado de torneira; I1-1, I1-2, I2-1 e I2-2: isolados de inundação.

5.5 Ensaios de patogenicidade

Devido à dificuldade de se obter cultura em fase exponencial de crescimento, os isolados R₂P₁-1, R₂P₁-2 e R₃P₂-2 não foram submetidos aos ensaios de patogenicidade. Todos os demais isolados cresceram nas temperaturas de 28°C e 37°C e nas concentrações de 0,1M e 0,5M de manitol, sendo que o crescimento só foi detectado a partir de 48 horas de cultivo (**Tabela 12**). Nenhum clone apresentou crescimento a 42°C e apenas os isolados A₁P₁-1, A₁P₁-2 e I1-2 não se desenvolveram a 1,0M de manitol (**Tabela 12**). Nos outros isolados o crescimento a 1,0M foi detectado somente a partir do quinto dia de incubação.

Tabela 12: Resultado dos ensaios de termotolerância e de osmotolerância nos isolados clonados de *Acanthamoeba* provenientes de amostras clínicas e ambientais.

ISOLADOS	ORIGEM	TERMOTOLERÂNCIA ^a			OSMOTOLERÂNCIA ^b		
		28°C	37°C	42°C	0,1M	0,5M	1,0M
Z-1	raspado de córnea	+	+	-	+	+	+
AAO-1		+	+	-	+	+	+
RNM-1		+	+	-	+	+	+
RNM LD-1	lente de contato	+	+	-	+	+	+
R ₃ P ₂ -1	poeira	+	+	-	+	+	+
A ₁ P ₁ -1	solo	+	+	-	+	+	-
A ₁ P ₁ -2		+	+	-	+	+	-
A ₂ P ₂ -1		+	+	-	+	+	+
A ₂ P ₂ -2		+	+	-	+	+	+
P ₁ P ₂ -1	piscina	+	+	-	+	+	+
P ₁ P ₂ -2		+	+	-	+	+	+
P ₄ P ₂ -1		+	+	-	+	+	+
P ₄ P ₂ -2		+	+	-	+	+	+
M9-1	mar	+	+	-	+	+	+
M9-2		+	+	-	+	+	+
M10-1		+	+	-	+	+	+
M10-2		+	+	-	+	+	+
RA ₁ P ₂ -1	torneira	+	+	-	+	+	+
RA ₁ P ₂ -2		+	+	-	+	+	+
RA ₃ P ₂ -1		+	+	-	+	+	+
RA ₃ P ₂ -2		+	+	-	+	+	+
I1-1	inundação	+	+	-	+	+	+
I1-2		+	+	-	+	+	-
I2-1		+	+	-	+	+	+
I2-2		+	+	-	+	+	+
TOTAL: 25		25	25	0	25	25	22

^{a, b} Toda expansão de trofozoítos que alcançou, no mínimo, 0,5 cm a partir da área central foi considerada crescimento.

6 DISCUSSÃO

A pesquisa de *Acanthamoeba* em amostras clínicas para a confirmação da mesma como agente etiológico de infecções no ser humano, bem como o estudo da presença de *Acanthamoeba* em diferentes habitats, seja ele natural ou artificial, têm sido realizados no mundo todo desde a descoberta do potencial patogênico dessas amebas. Apesar do crescente interesse médico e epidemiológico pelas infecções causadas por *Acanthamoeba*, principalmente pelos casos de ceratite amebiana, ainda são poucos os relatos dessas doenças no Brasil. E embora o isolamento de *Acanthamoeba* em alguns locais seja comum, ainda é escasso o conhecimento sobre a abundância dessas amebas em determinados ambientes.

Embora seja comumente descrita a utilização de *E.coli* para o isolamento primário de *Acanthamoeba* em amostras ambientais (JOHN e HAWARD, 1995; COSTA et al 2010; MAGNET et al, 2012), neste trabalho optou-se pela utilização dessas bactérias somente no cultivo de amostras clínicas e no cultivo de amostras provenientes de água potável. Levando em consideração que amostras ambientais já possuem uma microbiota associada, não há necessidade de um substrato alimentar adicional para o crescimento satisfatório de *Acanthamoeba* em ágar soja. E ainda, segundo Wang e Ahearn (1997), quantidades muito grandes de bactérias no meio, inclusive de *E. coli*, podem inibir o crescimento de *Acanthamoeba*. No entanto, partindo do pressuposto que a água potável, ao passar por uma série de processos de tratamento, pode não possuir uma microbiota suficiente para o desenvolvimento de *Acanthamoeba*, a essas amostras foi adicionada a suspensão de *E. coli*. Pelo mesmo motivo, as amostras de raspado de córnea e as lentes de contato dos pacientes com suspeita de ceratite amebiana foram cultivadas em ágar soja com a sobrecamada de *E. coli*, como descrito por Walochnik et al (2000a) e Di Cave et al (2009).

Ainda que o diagnóstico precoce de ceratite por *Acanthamoeba* seja essencial para um bom prognóstico, a confirmação dessa infecção não é possível de ser feita somente pelas características clínicas apresentadas pelo paciente. Isso porque, além dos primeiros sinais e sintomas serem inespecíficos e facilmente confundíveis com os de outros processos infecciosos da córnea, a evolução do quadro clínico é dependente de inúmeros fatores e pode variar de forma significativa entre um paciente e outro (ALVARENGA et al, 2000; WALOCHNIK et al, 2000a; DI CAVE et al, 2009). Já foi demonstrado, por exemplo, que podem ocorrer somente alterações epiteliais da córnea e que nem sempre há o envolvimento do estroma, com a formação do infiltrado em anel (CHEW et al, 2011). Di Cave et al (2009)

obtiveram o diagnóstico laboratorial de ceratite amebiana de um paciente sem qualquer sinal clínico característico, que apresentava somente sintomas de uma conjuntivite crônica. Dart et al (2009) relatam que a ausência de dor na fase inicial da doença não exclui a suspeita clínica de ceratite amebiana, uma vez que alguns pacientes não apresentam esse sintoma clássico em qualquer estágio do processo infeccioso. Além disso, a infecção por *Acanthamoeba* pode não ser a infecção primária, estando presente como uma suprainfecção, o que dificultaria ainda mais o diagnóstico clínico (LEDEE et al, 2009). Sendo assim, a detecção laboratorial de *Acanthamoeba* é fundamental para a confirmação da suspeita clínica de ceratite amebiana.

Dentre os oito casos de ceratite por *Acanthamoeba* confirmados neste trabalho, somente de AAO, ZCS, JSR e RNM foram obtidas amostras em cultura, sendo que a detecção de *Acanthamoeba* nas culturas de raspado de córnea e na cultura da lente de contato do paciente RNM foi realizada em intervalo mínimo de 24 horas e em intervalo máximo de seis dias após a incubação. Muitos trabalhos têm relatado a baixa sensibilidade da cultura, que na maioria das vezes não chega nem a 60% (ILLINGWORTH et al, 1995; RADFORD et al, 2002; TU et al, 2008). Utilizando material de biópsia de córnea de pacientes infectados, Lehmann et al (1998) demonstraram que a sensibilidade da cultura foi de somente 55%. Nos estudos de Yera et al (2006) e Dart et al (2009) os valores encontrados foram de 33 e 57% respectivamente.

Segundo Lehmann et al (1998), muitas vezes não é possível isolar *Acanthamoeba* a partir de amostras epiteliais da córnea devido ao pequeno tamanho ou à pequena quantidade de amostra coletada, à presença de amebas inviáveis, à coleta na fase inicial da infecção, quando ainda há poucas amebas nas lesões, e devido à falta de destreza no momento da coleta e do processamento das amostras. O tratamento prévio do paciente com antibióticos, antifúngicos ou antivirais também pode ser um fator interferente no sucesso do isolamento (WALOCHNIK et al, 2000a). Além disso, muitos estudos demonstram que, dependendo do número de amebas presentes na amostra e da habilidade das mesmas de crescer na temperatura de incubação escolhida (28°C a 37°C), a observação da presença de *Acanthamoeba* em cultura pode ser feita em poucas horas ou demorar mais de três semanas (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003; KHAN 2006; DART et al, 2009). Diante de todas as dificuldades técnicas e dos limites existentes para o isolamento de *Acanthamoeba* em cultura e, conseqüentemente, para o diagnóstico precoce de ceratite amebiana, neste trabalho foi utilizada a PCR do gene 18S rDNA como método diagnóstico complementar à cultura.

A utilização do gene 18S rDNA como alvo da técnica de PCR foi realizada pela primeira vez por Vodkin et al (1992). Desde então, *primers* para a amplificação de fragmentos desse gene têm sido testados e aprimorados por muitos autores (LEHMANN et al, 1998; MATHERS et al, 2000; SCHROEDER et al, 2001). Analisando a sequência completa do gene 18S rDNA de mais de 80 isolados de *Acanthamoeba*, Schroeder et al (2001) demonstraram que enquanto alguns pares de *primers* descritos para a identificação de *Acanthamoeba* amplificavam rDNA de outros gêneros de ameba, como *Balamuthia* e *Hartmannella*, outros não eram capazes de amplificar rDNA de todos os isolados descritos de *Acanthamoeba*. Esses autores comprovaram então que dois *primers*, o JDP1 e o JDP2, poderiam ser usados para a amplificação gênero-específica de *Acanthamoeba*, já que os mesmos não são capazes de amplificar rDNA de gêneros relacionados de AVL, como *Hartmannella*, *Naegleria*, *Leptomyxia* e *Balamuthia*, e nem de outros microorganismos que possam estar presentes na córnea, como helmintos, fungos do gênero *Fusarium*, bactérias do gênero *Pseudomonas*, entre outros. Por esses motivos, esses *primers* têm sido amplamente utilizados para a identificação de *Acanthamoeba* em amostras clínicas (CAVE et al. 2009; ABE e KIMATA, 2010; CARLESSO et al 2010). Segundo Mathers et al (2000), a detecção pela PCR de um pequeno número de *Acanthamoeba* é possível devido ao fato de que uma única ameba pode possuir mais de 100 cópias de rDNA.

Vale ressaltar que a importância clínica da especificidade da técnica de PCR em relação a outros gêneros de AVL se deve ao fato de que *Hartmannella*, *Naegleria*, *Vahlkampfia* e *Paravahlkampfia* podem estar associadas à infecção (KENNEDY et al 1995; AITKEN et al 1996; OZKOC et al 2008).

Além da pequena quantidade de organismos presentes nas lesões da córnea em determinadas fases da infecção e do tamanho reduzido da amostra epitelial obtida a partir do raspado de córnea (MATHERS et al, 2000), outro fator que poderia limitar a extração de DNA das amostras clínicas submetidas ao diagnóstico molecular neste trabalho é a grande resistência da parede dupla dos cistos de *Acanthamoeba*. Por esse motivo, a maioria dos procedimentos utilizados para a extração de DNA de *Acanthamoeba* é realizada em amostras que possuam formas trofozoíticas (GOLDSCHMIDT et al, 2007). Dados não publicados e obtidos pelos colaboradores deste estudo demonstram que o método do *kit ChargeSwitch®* é capaz de extrair material genético de pequenas quantidades de *Acanthamoeba* em amostra (uma a dez amebas), inclusive de suas formas císticas. Por isso, neste trabalho, as amostras

clínicas provenientes do esgotamento do raspado de córnea em salina de Page foram submetidas à extração de DNA proposta por esse *kit*, que se mostrou eficaz.

Além da amplificação com os *primers* JDP1 e JDP2, todas as amostras clínicas foram submetidas a outro tipo de PCR: a técnica da snPCR. Dhivya et al (2007) propuseram a utilização da snPCR para a identificação de *Acanthamoeba* pela primeira vez com o objetivo de aumentar a sensibilidade da detecção dessas amebas em amostras de raspado de córnea. A técnica consiste na realização de duas reações de PCR: a primeira utilizando os *primers* JDP1 e JDP2, tendo como DNA molde o produto da extração da amostra clínica, e a segunda utilizando o *primer* A1 (desenvolvido pelos autores) e o *primer* JDP2, tendo como DNA molde os amplificados da primeira reação. Esses autores demonstraram que a sensibilidade da snPCR era maior que a da PCR descrita por Schroeder et al (2001) e era de 100% em relação à cultura. Além disso, esses *primers* possibilitam uma reação específica, pois não amplificam DNA de vários organismos que podem estar presentes na córnea, como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Herpes simplex*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Toxoplasma gondii*.

A PCR e a snPCR foram realizadas nas amostras de dez dos 15 pacientes com suspeita de ceratite por *Acanthamoeba*. Todos os pacientes que foram diagnosticados por isolamento de *Acanthamoeba* em cultura (AAO, ZCS, JSR e RNM) também apresentaram diagnóstico molecular positivo. Quatro casos foram confirmados somente por PCR/snPCR (FCM, CFD, DCJ e MMM), sendo que o diagnóstico de FCM só foi realizado por snPCR. Não se pode descartar a possibilidade de que mais casos de ceratite amebiana poderiam ter sido diagnosticados se as amostras de todos os pacientes tivessem sido submetidas ao diagnóstico molecular. Isso não foi possível pois no momento em que alguns pacientes foram atendidos no HUCAM ainda não havia sido feita a padronização das técnicas pelo laboratório.

Embora o número de amostras analisadas neste trabalho não seja suficiente para demonstrar diferenças significativas entre a PCR e a snPCR, dados não publicados e obtidos pelos colaboradores deste estudo confirmaram a maior sensibilidade da snPCR em relação à PCR. Levando em consideração que a quantidade de amebas coletadas em salina é muito pequena, a menor sensibilidade exibida pela PCR pode ser explicada pelo pouco DNA pós-extração disponível para a amplificação. Como a snPCR é realizada com os produtos de amplificação da primeira, justifica-se o aumento da sensibilidade.

As técnicas de PCR confirmaram a suspeita de ceratite amebiana em quatro pacientes que apresentaram cultura negativa mesmo após 30 dias de leitura, sugerindo uma maior sensibilidade que a cultura, como já demonstram muitos trabalhos (YERA et al, 2006; DHIVYA et al, 2007; TU et al 2008). Os estudos de Lehmann et al (1998) tiveram como resultado uma sensibilidade de 84% da PCR de biópsias da córnea, de 66% da PCR de amostras lacrimais e de 85% quando a PCR era realizada em ambas as amostras. Além disso, esses autores demonstraram também que a sensibilidade da cultura quando comparada com a da PCR de ambas as amostras era de 59% e que a sensibilidade da PCR em relação à cultura era de 100%. Mathers et al (2000) demonstraram que a sensibilidade da PCR foi de 77% e Pasricha et al (2003) relataram uma sensibilidade da técnica de 87,5%.

Considerando que o diagnóstico de ceratite amebiana não é realizado precocemente devido a um conjunto de fatores, que incluem o atraso no diagnóstico clínico, a baixa sensibilidade da cultura e o tempo demandado pela mesma para a obtenção de resultados conclusivos, a rapidez com que as técnicas de PCR podem ser realizadas (menos de 15 horas) permite pelo menos que, a partir do momento em que ocorre a suspeita clínica de ceratite por *Acanthamoeba*, a detecção laboratorial seja realizada de forma rápida.

A maioria dos isolados ambientais de *Acanthamoeba* obtidos até hoje são provenientes de amostras de água (JOHN e HOWARD, 1995). Quando comparamos, por exemplo, o número de estudos desenvolvidos em sistemas de água, rios, piscinas, lagos, entre outros, com o número de relatos de isolamento de *Acanthamoeba* a partir de amostras de poeira, percebemos que os últimos são significativamente menores, no Brasil e no mundo. Isso pode ser explicado pelo fato de que a exposição à água contaminada é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de infecções por *Acanthamoeba*, principalmente de ceratite amebiana (VESALUOMA et al, 1995; LORENZO-MORALES, 2005c). No entanto, existem outras fontes de contaminação, como a poeira e o solo. Seal (1992) demonstrou que amostras de poeira são fontes potenciais de contaminação de lentes de contato e seus estojos de armazenamento e casos de ceratite amebiana já foram diagnosticados após trauma ocular ocasionado por partículas de poeira (LAM et al, 2002). Além disso, a lesão da córnea por agentes físicos é o principal fator predisponente em indivíduos que não são usuários de lentes de contato e boa parte desses traumatismos é ocasionada por agentes relacionados direta ou indiretamente com o solo, como folhas, madeira, plantas, água parada, entre outros (DART et al, 2009).

Estudos realizados por Kingston e Warhust (1969), Seal (1992), Rezaeian et al (2008) e por Niiyati et al (2009) demonstraram o isolamento de *Acanthamoeba* da poeira de residências, de lugares públicos e de hospitais. No Brasil, Teixeira et al (2009) avaliaram a presença de AVL em lugares públicos e observaram um índice de positividade que variou de 11 a 19% para o gênero *Acanthamoeba*. Além disso, amostras de poeira de cinco hospitais localizados em diferentes estados foram avaliadas quanto à presença de *Acanthamoeba* por vários autores, obtendo-se percentuais de positividade que variaram de 23 a 100% (SILVA e ROSA, 2003; CARLESSO et al 2010; COSTA et al 2010, ZANELLA et al 2012). Neste estudo, foi isolada *Acanthamoeba* em três (30%) amostras de poeira, de um total de dez amostras coletadas em três diferentes residências.

Foi proposta também neste estudo a pesquisa de *Acanthamoeba* em amostras de solo. Todas as dez amostras coletadas foram positivas para *Acanthamoeba* (100%) e esse resultado foi compatível com os de alguns trabalhos citados na literatura. No Brasil, Alves et al (2012) detectaram a presença de *Acanthamoeba* em todas as amostras de solo coletadas. Na Turquia e no Iran, respectivamente, os trabalhos de Kilic et al (2004) e de Rezaeian et al (2008) também apresentaram índices de positividade de 100%. No entanto, baixos percentuais também já foram relatados. Lorenzo-Morales et al (2005b) obtiveram uma positividade de 37,7% nas amostras de solo analisadas. Brown et al (1982) isolaram *Acanthamoeba* somente em 10% das amostras de solo obtidas de uma região da Antártica. Segundo Sawyer (1989), o índice de positividade de *Acanthamoeba* no solo é proporcional ao nível de contaminação por esgoto a que o mesmo está exposto.

As fontes de água para uso recreacional, principalmente os diferentes tipos de piscinas existentes, representam um importante fator de risco para a saúde humana, uma vez que albergam várias espécies potencialmente patogênicas de *Acanthamoeba* (LORENZO-MORALES, 2005c). Por isso, muitos estudos já foram realizados no mundo todo com o objetivo de determinar a prevalência desse e de outros gêneros de AVL em amostras de piscina (VESALUOMA et al 1995; INIT et al, 2010). Os índices de positividade para a presença de *Acanthamoeba* são bem variáveis entre um estudo e outro e parecem não ter relação direta com o tipo de piscina analisada (particular, pública, coberta, externa, aquecida, entre outros) (GÓRNIK e KUZNA-GRYGIEL, 2004; CAUMO et al 2009). Por exemplo, no Chile, Muñoz et al (2003) isolaram *Acanthamoeba* em somente 4,7% das amostras de piscinas públicas analisadas; No Brasil, Caumo et al (2009) detectaram a presença de *Acanthamoeba* em 20% das amostras de água de piscina coletadas, e não houve diferença significativa entre

as piscinas aquecidas e as não aquecidas; e Górník e Kuzna-Grygiel (2004), na Polônia, obtiveram um índice de positividade de 59,7%, sendo que não houve diferença entre as piscinas cobertas e não cobertas analisadas.

Apesar de já terem sido propostos diferentes volumes de coleta e diferentes métodos de concentração para o isolamento de *Acanthamoeba* a partir de água de piscina, neste trabalho optou-se por coletar as amostras em tubos de 50 ml, proceder à concentração das mesmas por centrifugação e não utilizar *E. coli*, como descrito por Gianinazzi et al (2009). Já a coleta do sedimento das escadas e dos filtros foi realizada conforme descrito por Init et al (2010), sem a utilização de *E.coli*. Dessa forma, o índice de positividade obtido foi de 16,6% (cinco amostras do sedimento da escada e do filtro de quatro piscinas), sendo que em nenhuma amostra de água houve a detecção de *Acanthamoeba*. Segundo De Jonckheere (1979), é provável que o maior percentual de isolamento de AVL nas paredes e no fundo das piscinas se deva ao fato de que nesses locais os cistos estão mais protegidos da ação do cloro, e ainda, segundo Init et al (2010), as paredes das piscinas são colonizadas por vários tipos de microorganismos, como algas e bactérias, que ao serem utilizados como alimento possibilitam a proliferação de *Acanthamoeba* nesses locais. Dessa forma, justifica-se o isolamento de *Acanthamoeba* somente nas amostras coletadas da escada e do filtro neste trabalho.

De acordo com os índices de prevalência obtidos nos trabalhos citados na literatura, o volume de água e o modo como é feita a filtração e a concentração das amostras parecem ser somente alguns dos fatores que interferem na obtenção de isolados de *Acanthamoeba* a partir de amostras de água de piscina, não sendo determinante em todos os casos. Por exemplo, Muñoz et al (2003) obtiveram índices baixos de positividade (4,7%) após a coleta de 800-1000 ml de água, seguida de decantação e centrifugação; Vesaluoma et al (1995) isolaram *Acanthamoeba* em somente 8% das amostras de piscinas após a centrifugação de 1000 ml de água; Gertiser et al (2010), por meio da concentração de 470 ml de água por decantação e posterior centrifugação do material decantado, obtiveram 26% de positividade; e Caumo et al (2009) isolaram *Acanthamoeba* em 20% das amostras a partir de 300 ml de água de piscina, filtrada com gaze antes da centrifugação; Por sua vez, Marcomini (2009) obteve um percentual de positividade de 85,7% coletando somente 3 ml de água, supondo, então, que a chance de encontrar *Acanthamoeba* em piscinas está relacionada com o grau de contaminação das mesmas. Neste sentido, De Jonckheere (1979) já havia demonstrado a possibilidade de isolar *Acanthamoeba* em amostras de apenas 1 ml da superfície de piscinas e Vesaluoma et al

(1995) justificaram o baixo índice de detecção de *Acanthamoeba* obtido devido à limpeza e desinfecção eficientes das piscinas analisadas.

Muitos estudos também têm sido realizados com o objetivo de determinar a prevalência de *Acanthamoeba* em amostras de água tratada em áreas urbanizadas. Os resultados dos trabalhos citados na literatura demonstram que a água de torneira é uma fonte potencial de contaminação, principalmente das lentes de contato e dos estojos de armazenamento das mesmas (KILVINGTON et al 2004; BOOST et al. 2008; BAGHERI et al, 2010). Segundo Jeong e Yu (2005), as diferenças observadas nos níveis de contaminação da água por *Acanthamoeba* em diferentes países e regiões poderiam ser explicadas pelo fato de que em cada local a água é submetida a um tipo de tratamento e de que uma população pode possuir hábitos higiênicos e de manutenção da água diferentes de outras. Em seu trabalho, por exemplo, esses autores demonstraram que a contaminação da água potável por *Acanthamoeba* em uma cidade da Coreia do Sul (5,8% das amostras coletadas) não se originava nas estações de tratamento, mas sim nos tanques de armazenamento das residências. Shoff et al (2008) obtiveram um percentual de positividade de 2,8% ao analisarem 283 amostras provenientes de reservatórios residenciais de água em uma cidade dos Estados Unidos. Magnet et al (2012), por sua vez, demonstraram o isolamento de *Acanthamoeba* em água obtida do processo final de purificação em estações de tratamento de água na Espanha.

Neste contexto, muitos métodos de coleta e isolamento de *Acanthamoeba* a partir de amostras de água potável já foram propostos e diferentes índices de positividade já foram obtidos no mundo todo. No Iran, Bagheri et al (2010) coletaram e filtraram 4 L de água tratada de hospitais e detectaram *Acanthamoeba* em 48% das amostras; Zanella et al (2012) isolaram *Acanthamoeba* em 40% das amostras de 200 ml de água de um hospital no Brasil após a centrifugação das mesmas; também no Brasil, Winck et al (2011) isolaram *Acanthamoeba* em 9,5% das amostras analisadas após a coleta e filtração de 1000 ml de água de escolas; Por sua vez, Rezaeian et al (2008), em um hospital no Iran, não obtiveram isolados de *Acanthamoeba* após a coleta e filtração de 500 ml de água; e Lorenzo-Morales et al (2005a, c) chegaram a obter um percentual de positividade de 59,5 e 26,4% coletando e filtrando 1000 ml de água potável na Espanha e na Jamaica, respectivamente.

Neste trabalho, a coleta e a concentração de água de torneira, assim como a coleta do biofilme da saída de água das mesmas, foram realizadas conforme descrito por Seal (1992) e Kilvington et al (2004), com uma pequena modificação no volume de água coletado. Dessa

forma, foram obtidos isolados de *Acanthamoeba* em 10% das amostras coletadas, sendo que nenhuma amostra de água foi positiva. As duas amostras em que foi detectada a presença de *Acanthamoeba* foram provenientes do biofilme das torneiras. Segundo Seal (1992), é possível que os microorganismos (bactérias e AVL) aderidos à torneira sejam carregados pela água e se depositem no ambiente doméstico, bem como em lentes de contato e seus estojos. No trabalho de Kilvington et al (2004), foi considerada como amostra de água potável somente o biofilme coletado do bico das torneiras e esses autores detectaram contaminação por *Acanthamoeba* em uma ou mais torneiras em oito (30%) das 27 residências analisadas. Ainda segundo esses autores, a presença de um biofilme na saída das torneiras poderia explicar a abundância de AVL nesses locais. Neste estudo, duas residências (40%) apresentaram amostras de torneira positivas, em um total de cinco residências analisadas.

Neste trabalho, foi proposta também a coleta de água de inundação para a pesquisa de *Acanthamoeba*. A metodologia utilizada foi a mesma que a proposta por John e Howard (1996) para a coleta de água em lagoas, excluindo-se a adição de *E.coli*. Sendo assim, foram obtidos isolados de *Acanthamoeba* em 100% das amostras coletadas.

Considerando que as inundações afetam cidades em vários países, boa parte da população mundial é exposta direta ou indiretamente aos agentes infecciosos transportados por essas águas. Neste estudo, pôde ser demonstrada pela primeira vez no Brasil a alta prevalência de *Acanthamoeba* em inundações e, conseqüentemente, o risco de desenvolvimento de infecções causadas por esses protozoários após o contato com essas águas. O alto índice de positividade obtido neste trabalho pode ser justificado pelo fato de que alguns pontos selecionados para a coleta se situavam próximos a canais de esgoto, além disso, a água de inundação é formada naturalmente por resíduos de solo e poeira. No entanto, há outras implicações importantes da presença de *Acanthamoeba* em água de inundação e do maior risco de contaminação da população. Nos Estados Unidos, Meier et al (1998) investigaram a causa de um surto de ceratite por *Acanthamoeba* e demonstraram o efeito provável das inundações no aumento da incidência dessa infecção. Segundo esses autores, a água de inundação teria invadido e contaminado o sistema de tratamento de água em várias regiões do país, aumentando a exposição da população a esses organismos.

Apesar de ser frequente o isolamento de *Acanthamoeba* das mais variadas coleções de água, a presença desses organismos no mar e em áreas salobras ainda é pouco investigada. Como apontado por Page em 1988, atualmente ainda é contrastante o entendimento que se

tem sobre a ecologia desses protozoários no solo e na água doce em relação ao volume de informações existentes sobre o papel que *Acanthamoeba* exerce no ambiente marinho. Devido ao fato de que todos os dados existentes são provenientes de estudos em outros países (LORENZO-MORALES et al, 2005a, c; LIU et al, 2006) e que, por isso, não se conhece a prevalência dessas amebas em águas salgadas no Brasil, foi proposta também neste trabalho a pesquisa de *Acanthamoeba* em amostras de água do mar.

Embora os poucos trabalhos citados na literatura descrevam a utilização de maiores volumes de água e outros métodos de concentração para o isolamento de *Acanthamoeba* a partir de água do mar (SAWYER, 1990; LLOVES et al, 1996; LORENZO-MORALES et al, 2005a, c), a metodologia empregada neste trabalho foi a mesma que a utilizada para a coleta de água de inundação. Dessa forma, foram obtidos isolados de *Acanthamoeba* em três (30%) amostras de mar, em um total de dez amostras coletadas.

No entanto, o fato interessante observado neste trabalho foi que dentre os quatro pontos de coleta onde havia uma fonte pontual de lançamento de esgoto (09, 10, 11 e 12), foi detectada *Acanthamoeba* em três deles (09, 10 e 11). O ponto 09, além de receber despejo direto de esgoto doméstico, está localizado à foz do Canal de Camburi, que recebe o esgoto da cidade de Vitória ao longo de boa parte de sua extensão; e nos pontos 10, 11 e 12 é despejado diretamente o esgoto de bairros próximos. Possivelmente, o baixo movimento das marés verificado nesses pontos contribui para a estagnação do esgoto no local. Vale ressaltar ainda que em todos os pontos de onde foram obtidas amostras para análise, independente do nível de contaminação por esgoto a que a praia estava exposta, foi observada algum tipo de atividade humana (pesca, navegação, recreação, entre outras) e isso confirma que a exposição à água do mar exerce um papel importante como fator de risco para indivíduos susceptíveis ao desenvolvimento de EAG e principalmente de ceratite por *Acanthamoeba* (LORENZO-MORALES et al, 2005a, c; LIU et al, 2006).

Neste estudo, a detecção de *Acanthamoeba* exclusivamente em amostras do mar provenientes de pontos onde ocorre uma intensa contaminação por esgoto poderia ser explicada pela presença em abundância de bactérias, que servem de substrato alimentar para essas amebas (WANG e AHEARN, 1997; KHAN, 2006). Sawyer et al (1977), após o isolamento de cinco espécies de *Acanthamoeba* a partir de sedimentos do oceano contaminados por esgoto e de águas salobras de canais de navegação, levantaram a hipótese de que essas amebas seriam transportadas da água doce e do solo para esses locais pela

correnteza de rios, pelo despejo de esgoto e pela prática de dragagem. Posteriormente, Sawyer et al (1982), ao analisarem amostras de sedimento oceânico coletadas próximo a estações de lançamento de esgoto e amostras de sedimento coletadas em áreas livres de contaminação, demonstraram a forte correlação existente entre a presença de bactérias fecais e *Acanthamoeba*. Esses autores isolaram espécies de *Acanthamoeba* a mais de 90 km da costa, onde a presença de bactérias estava associada à contaminação direta ou indireta por esgoto. Ainda segundo esses autores, o índice de positividade para *Acanthamoeba* em sedimento oceânico livre de contaminação por bactérias varia de 1 a 2%, enquanto que esse índice pode chegar a 100% em amostras provenientes de locais onde a abundância de bactérias é decorrente da contaminação por esgoto. Da mesma forma, Lorenzo-Morales et al (2005c) coletaram amostras de água do mar em locais poluídos e obtiveram um percentual de positividade de 49,6%; e Munson e Paget (2006) demonstraram o isolamento de *Acanthamoeba* em 82,9% das amostras de sedimento costeiro analisadas, todas coletadas em locais expostos à contaminação direta ou indireta por esgoto. Recentemente, Kao et al (2012), ao analisarem a influência da qualidade da água na prevalência de *Acanthamoeba* em amostras de rio, observaram uma correlação significativa entre a concentração de coliformes totais e a presença de *Acanthamoeba* nas amostras de água analisadas.

Diante da ubiquidade do gênero *Acanthamoeba*, já se questionou se a presença do mesmo na água salgada e no sedimento marinho seria natural ou uma consequência das atividades humanas (SAWYER et al, 1982). No entanto, segundo Page (1983), espécies de *Acanthamoeba* são organismos cujos nichos naturais são o solo e a água doce, porém, muito bem adaptados e capazes de sobreviver sob diferentes condições adversas, e isso inclui variações na salinidade do meio. Lloves et al (1996) isolaram *Acanthamoeba* em 100% das amostras de água coletadas em um estuário na Espanha, demonstrando essa capacidade de adaptação. Além disso, já foi comprovado que espécies marinhas de amebas não são capazes de se desenvolver em ágar que apresente uma baixa salinidade, enquanto que *Acanthamoeba* se desenvolve muito bem tanto em ágar comum como em ágar preparado com diferentes níveis de salinidade (SAWYER et al, 1977; PAGE, 1983; BOOTON et al, 2004).

Após a identificação de *Acanthamoeba* nas culturas das amostras coletadas, a maior dificuldade encontrada para a manutenção dos isolados foi a eliminação da microbiota associada, principalmente nos isolados ambientais. Como já havia sido apontada por Schuster (2002), a maior dificuldade de se obter isolados de AVL a partir de amostras ambientais é eliminar organismos indesejados, como bactérias, fungos, algas, entre outros, e promover

simultaneamente o crescimento das amebas. Segundo Zanella et al (2012), o isolamento de *Acanthamoeba* em culturas apropriadas para a realização de determinados experimentos pode levar de sete a 60 dias, sendo comum a perda dos isolados devido à contaminação em excesso por fungos e bactérias. Dentro deste contexto, muitas técnicas de diluição e micromanipulação já foram propostas para facilitar o isolamento e a clonagem de *Acanthamoeba* (LLOVES et al, 1996; COSTA et al 2010; ZANELLA et al, 2012). Apesar de laboriosa, a estratégia utilizada neste estudo, que incluiu a diluição e a micromanipulação das amostras, mostrou-se eficiente: somente três (7,9%) culturas positivas não foram mantidas e foram obtidos 28 clones para a realização dos experimentos subsequentes.

Neste trabalho, foram utilizadas culturas clonadas para a realização dos estudos propostos pois a presença de mais de uma linhagem de *Acanthamoeba* tem sido relatada tanto em amostras ambientais como em amostras clínicas (WALOCHNIK et al, 2000a; ALVES et al, 2000; COSTA et al 2010). Como Page (1988) afirmou, a obtenção de clones é essencial para a realização de estudos taxonômicos, e o mesmo é válido para a taxonomia molecular empregada atualmente. A presença de diferentes linhagens em uma mesma amostra pode dificultar o sequenciamento gênico pois múltiplas sequências nucleotídicas podem ser detectadas simultaneamente (BOOTON et al, 2002; CHAN et al, 2011). Além disso, a correta interpretação dos resultados nos ensaios de patogenicidade requer a obtenção de culturas clonadas.

Após uma análise prévia da morfologia de todos os isolados originais para a identificação do gênero *Acanthamoeba*, as características morfológicas dos cistos dos isolados clonados foram analisadas em detalhe e utilizadas para a classificação do gênero. Devido à dificuldade de se obter a identificação precisa das espécies de *Acanthamoeba*, a caracterização morfológica dos cistos descrita por Pussard e Pons (1977) é até hoje a principal referência para a classificação de *Acanthamoeba*. Em geral, a maioria dos isolados de *Acanthamoeba*, provenientes tanto de amostras ambientais como de amostras clínicas, pertencem ao grupo II (WALOHNICK et al, 2000b; BOOTON et al, 2005; CAUMO et al, 2009). Dessa forma, este trabalho confirma os dados da literatura, uma vez que a maioria dos clones obtidos apresentou características morfológicas do grupo II. Somente um isolado (A₁P₁-2), proveniente do solo, foi classificado como pertencente ao grupo I.

Embora a análise das características morfológicas dos cistos de *Acanthamoeba* seja a principal ferramenta para a identificação e para a taxonomia do gênero, são comuns variações

na morfologia dos cistos de um mesmo isolado clonado (PAGE, 1988). Neste trabalho, muitas amostras clonadas apresentaram essas variações, principalmente no número de braços do endocisto, como já foi demonstrado por outros autores (WALOCHNIK et al, 2000a; COSTA et al, 2010; CHAN et al, 2011). Por este motivo, o formato do endocisto da maioria dos clones estudados não pôde ser determinado com precisão, sendo classificado como poliédrico. Além disso, muitas vezes a distinção entre as espécies de *Acanthamoeba* e até mesmo entre os grupos morfológicos de Pussard e Pons (1977) é difícil de ser realizada com segurança, pois em determinadas condições as diferenças são muito sutis e difíceis de serem determinadas de forma precisa, o que torna limitado o uso da morfologia como único critério taxonômico (PAGE, 1988; CHAN et al 2011; ALVES et al 2012). Sendo assim, diante dessas limitações, justifica-se a dificuldade encontrada neste trabalho em se obter uma classificação definitiva para o isolado RA₃P₂-2.

A técnica de PCR descrita por Schroeder et al (2001), inicialmente aplicada neste trabalho como parte da metodologia do diagnóstico molecular dos casos suspeitos de ceratite amebiana, foi utilizada também para a confirmação do gênero *Acanthamoeba* nos isolados ambientais. Como discutido anteriormente, os *primers* (JDP1 e JDP2) utilizados por esses autores amplificam uma região conservada do gene 18S rDNA, permitindo uma identificação gênero-específica de *Acanthamoeba*. Levando em consideração que o reconhecimento do gênero é relativamente fácil de ser realizado por parâmetros morfológicos e que amostras ambientais não exigem métodos rápidos de identificação, como é o caso das amostras clínicas, a utilização da PCR se justifica pelo fato de que diversos gêneros de AVL podem estar presentes nas culturas, o que dificultaria o reconhecimento de *Acanthamoeba*. Além disso, o sequenciamento do amplificado obtido por meio dessa técnica (ASA.S1) pode ser utilizado posteriormente para a classificação genotípica.

Dessa forma, todos os isolados clonados foram confirmados como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* pela PCR. Ao contrário do que geralmente acontece com as amostras de raspado de córnea, o grande número de organismos obtidos em cultura permite que o DNA seja extraído em quantidade suficiente para que os produtos de amplificação sejam facilmente visualizados. Para isso, o método de extração utilizado foi a lise alcalina descrita por Vianna et al (2009). Essa técnica foi originalmente adaptada para a extração de DNA de *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* nas fezes e sua eficácia na extração de DNA de trofozoítos de *Acanthamoeba* foi demonstrada em estudos realizados pelos colaboradores deste trabalho

(dados não publicados). Além disso, esse método foi escolhido pela facilidade e baixo custo de execução.

Embora a amplificação com os *primers* JDP1 e JDP2 tenha sido utilizada para a identificação em nível de gênero, vale destacar que existe a possibilidade de que as variações observadas no tamanho dos fragmentos de amplificação do isolado RA₃P₂-2, do isolado pertencente ao grupo morfológico I (A₁P₁-2) e dos isolados do grupo II correspondam à distância filogenética existente entre os grupos morfológicos de Pussard e Pons (1977), como demonstrado por Stothard et al (1998).

Ainda que o sequenciamento completo do gene 18S rDNA possibilite a determinação dos genótipos de *Acanthamoeba* de uma forma mais precisa e confiável, principalmente dos genótipos filogeneticamente muito próximos, Schroeder et al (2001) demonstraram que o fragmento ASA.S1 apresenta variações interespecíficas suficientes em sua sequência para diferenciar vários genótipos. Sendo assim, a maioria dos isolados ambientais e todos os isolados clínicos sequenciados neste trabalho foram classificados como pertencentes ao genótipo T4, como tem sido demonstrado no mundo todo por diferentes autores.

No estudo de Tsvetkova et al (2004), os genótipos de todos os isolados ambientais foram identificados como T4; Booton et al (2005) demonstraram que 55,3% das amostras ambientais incluídas em seu trabalho pertenciam ao genótipo T4; Kao et al (2012), ao analisarem as sequências de 34 amostras ambientais de *Acanthamoeba*, classificaram 19 delas como pertencentes ao genótipo T4; dentre as amostras de poeira estudadas por Niyiyati et al (2009), 84,6% foram classificadas como T4; e dados similares foram obtidos por Khan et al (2002). Em isolados de ceratite amebiana essa prevalência é ainda maior: estima-se que mais de 90% dos casos sejam causados por cepas de genótipo T4 (STOTHARD et al, 1998; SCHROEDER et al, 2001; BOOTON et al, 2005). Stothard et al (1998) demonstraram que 17 dentre os 18 isolados de ceratite por *Acanthamoeba* eram classificados como T4; nos estudos de Booton et al (2002 e 2005), o genótipo T4 foi determinado em 100 e 94,3% dos isolados obtidos de pacientes com ceratite amebiana, respectivamente. Recentemente, no trabalho de Ledee et al (2009), o genótipo T4 foi identificado em 95,2% das amostras de raspado de córnea obtidas de casos de ceratite. Nagyová et al (2010), ao analisarem as sequências de cinco isolados de ceratite por *Acanthamoeba*, classificaram três deles como T4 e Abe e Kimata (2010) e Magnet et al (2012) identificaram o genótipo T4 em 100% das amostras obtidas de pacientes com ceratite.

No entanto, ainda não se sabe se o papel desempenhado pelo genótipo T4 na epidemiologia das infecções causadas por *Acanthamoeba*, principalmente da ceratite amebiana, é devido ao fato de que esse é o genótipo mais abundante no ambiente ou se é devido à alta virulência do mesmo. Booton et al (2005) levantaram a hipótese de que a prevalência do genótipo T4 nos isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba* poderia ser explicada pela maior capacidade de adaptação desse genótipo às condições de cultivo quando comparada a dos outros, e não pelo fato de que o genótipo T4 seria o mais abundante na natureza. No entanto, esses mesmos autores e alguns estudos recentes confirmam a predominância do genótipo T4 por meio da extração direta de DNA a partir de amostras ambientais e clínicas, sem o isolamento prévio em cultura (ABE e KIMATA, 2010; MAGNET et al, 2012).

Ainda não há um consenso sobre o assunto, porém, já foi demonstrado que existem linhagens patogênicas e não patogênicas pertencentes ao genótipo T4 (WALOCHNIK et al, 2000b; ALVES et al, 2012; KHAN et al, 2002). Além disso, já foi demonstrado também que outros genótipos de *Acanthamoeba* apresentam potencial patogênico (WALOCHNIK et al, 2000a; LORENZO-MORALES et al, 2006; CARLESSO et al, 2010). Walochnik et al (2000b) demonstraram em seu estudo que as linhagens sem relevância clínica pertencentes ao grupo T4 eram filogeneticamente mais próximas entre si do que de linhagens patogênicas do mesmo genótipo. Segundo esses autores, esses dados corroboram a idéia de Stothard et al (1998) de que a capacidade de *Acanthamoeba* causar ceratite teria surgido como um evento único durante a evolução e que a virulência de muitas linhagens teria sido perdida durante o percurso evolutivo do gênero.

No Brasil, oito trabalhos relatam a distribuição genotípica de isolados de *Acanthamoeba*, sendo que somente dois deles demonstram a genotipagem de isolados clínicos. Dessa forma, já foram identificados no Brasil: o genótipo T4 em amostras de água potável; T3, T4 e T5 em amostras de poeira; T3, T4 e T5 em água de piscina; T4, T5 e T13 em amostras de solo e coleções de água; T2, T4 e T6 em amostras de água potável; T2/6, T4 e T5 em coleções de água e piscina; T4 e T11 em amostras de poeira; e T9 e T17 em amostras de água de rio e de reservatório, solo e húmus, por Magliano et al (2009); Carlesso et al (2010); Caumo e Rott (2011); Magliano (2011); Winck et al (2011); Alves et al (2012); Duarte et al (2013) e Magliano et al (2012), respectivamente. No estudo de Magliano (2011), 11 isolados de ceratite amebiana também foram classificados como pertencentes ao genótipo T4; e no trabalho de Duarte et al (2013), quatro isolados clínicos de pacientes com ceratite por

Acanthamoeba foram identificados como T4. Sendo assim, este é o primeiro trabalho a identificar o genótipo T1 em isolados ambientais de *Acanthamoeba* no Brasil, o segundo a identificar o genótipo T11 e o terceiro a classificar por genotipagem isolados clínicos obtidos de casos de ceratite no Brasil.

De acordo com a literatura, não é comum o isolamento de T1 e T11 do ambiente, sendo que somente o grupo sequencial T11 é descrito como agente etiológico de ceratite amebiana. Até o momento, o genótipo T1 só foi isolado de casos de EAG (STOTHARD et al, 1998; KHAN et al, 2002; BOOTON et al, 2005). Neste estudo, o genótipo T1 e T11 foram isolados, respectivamente, de amostras de poeira e de piscina. Lorenzo-Morales (2005c), ao analisarem isolados de *Acanthamoeba* provenientes de coleções de água na Jamaica, demonstraram a presença do genótipo T1 em água de torneira e em água do mar, e do genótipo T11 em água de rio, mar e torneira; e Niyiyati et al (2009) isolaram, no Irã, o genótipo T11 em amostras de poeira. É interessante destacar que o trabalho de Duarte et al (2013), único estudo no Brasil que identificou o genótipo T11 em isolado ambiental até o momento, foi realizado com amostras coletadas no Espírito Santo.

A análise das sequências nucleotídicas dos isolados estudados demonstrou também que a comparação das mesmas com as sequências de espécies de *Acanthamoeba* disponíveis no *GenBank* não é uma ferramenta confiável para a identificação específica do gênero. Os isolados I1-1 e M9-2, por exemplo, apresentaram similaridade máxima (99%) com quatro espécies diferentes. Dessa forma, os resultados apresentados neste trabalho corroboram os dados da literatura, que demonstram as inconsistências da identificação de espécies de *Acanthamoeba* baseada no sequenciamento gênico. No trabalho de Walochnik et al (2000b), um dos isolados estudados, classificado como *A. hatchetti* (espécie pertencente ao grupo morfológico II), apresentou sequência genotípica do tipo T6, obtida até então somente de isolados de *A. palestinensis*, espécie classificada no grupo III. Stothard et al (1998) também descreveram uma cepa com características morfológicas do grupo II que apresentava sequência típica do grupo III. Devido, então, à impossibilidade de se obter uma identificação precisa das espécies de *Acanthamoeba*, alguns autores defendem que as espécies pertencentes ao mesmo genótipo deveriam receber uma única denominação (STOTHARD et al, 1998; WALOCHNIK et al, 2000b; KONG, 2009).

Embora a termotolerância e a osmotolerância possam ser utilizadas na caracterização prévia de isolados de *Acanthamoeba*, a validade desses testes como determinantes da

patogenicidade dessas amebas vem sendo questionada por muitos autores (DE JONCKHEERE, 1980; COSTA et al, 2010; DUARTE et al, 2013). Como apontado por Walochnik et al (2000a, b), algumas partes do corpo humano apresentam temperaturas inferiores a 37°C, como é o caso do olho, cuja temperatura é de aproximadamente 34°C. Por esse motivo, deveria ser levado em consideração que o crescimento de *Acanthamoeba* a 37°C ou mais poderia ser um marcador adequado de patogenicidade para a capacidade de determinadas cepas causar EAG, e não um fator determinante para o desenvolvimento de ceratite amebiana. Entretanto, considerando a proposta de Griffin (1972), todos os isolados ambientais analisados neste estudo poderiam ser considerados potencialmente patogênicos, já que todos cresceram a 37°C, assim como todos os isolados clínicos.

No entanto, já foi demonstrado que linhagens de *Acanthamoeba* não patogênicas *in vivo* podem ser termotolerantes (DE JONCKHEERE, 1980). No trabalho de Costa et al (2010), por exemplo, um isolado pertencente ao grupo morfológico I de Pussard e Pons (1977), que teoricamente inclui espécies de *Acanthamoeba* que demonstram pouco ou nenhum potencial patogênico, apresentou um crescimento significativamente maior a 42°C do que um isolado do grupo II. Deve-se ressaltar ainda que o contrário também já foi descrito. Nos estudos de De Jonckheere (1980), duas cepas que não se desenvolveram a 40°C apresentaram efeito citopático significativo e levaram a óbito animais experimentais; e Duarte et al (2013) demonstraram que nenhum dos quatro isolados de *Acanthamoeba* obtidos de casos de ceratite amebiana foram capazes de crescer a 42°C.

Da mesma forma, o fato de um isolado apresentar ou não resistência à variação molar do meio nem sempre pode ser utilizado como um critério conclusivo a respeito do seu potencial patogênico (CHAN et al, 2011). Duarte et al (2013), por exemplo, demonstraram que três dos quatro isolados clínicos de *Acanthamoeba* analisados não foram tolerantes à concentração de manitol a 1M em cultivo monoxênico, apesar de terem sido isolados de lesões da córnea de pacientes com ceratite amebiana. No entanto, levando em consideração o que foi proposto por Khan et al (2001), todos os isolados deste trabalho que apresentaram crescimento a 1M de manitol poderiam ser considerados potencialmente capazes de causar infecção.

Outro aspecto importante que deve ser considerado em relação a esses ensaios de patogenicidade é a falta de padronização e a subjetividade quanto à interpretação dos resultados. Apesar de ter sido originalmente proposto que um isolado potencialmente

patogênico de *Acanthamoeba* exibe crescimento a, no mínimo, 37°C e 1M de manitol (GRIFFIN, 1972; KHAN et al, 2001), diferentes temperaturas e concentrações de manitol já foram utilizadas como discriminantes de patogenicidade em vários trabalhos. Até mesmo várias formas de interpretação do crescimento dos isolados, diferentes períodos de execução dos experimentos e diferentes tamanhos de inóculos já foram propostos (CAUMO et al, 2009; NAGYOVÁ et al, 2010; MAGLIANO et al, 2012).

No trabalho de Magliano et al (2012), isolados ambientais foram expostos durante quatro dias a temperaturas de 28°C, 37°C e 40°C e a concentrações de 0,25M, 0,5M, 0,75M e 1,0M de manitol, sendo que todos os isolados cresceram nas três temperaturas e até 0,75M de manitol, sendo considerados potencialmente patogênicos; Wink et al (2011) submeteram suas amostras a 30°C, 37°C e 42°C e a 0,5M e 1,0M de manitol durante 10 dias e consideraram como não patogênicos aqueles isolados que não se desenvolveram em nenhuma das condições extremas (42°C e 1M); nos testes realizados por Chan et al (2011), as temperaturas de incubação foram: 37°C e 42°C, sendo que a viabilidade dos isolados também foi testada após um período *overnight* a 46°C e 52°C, enquanto que somente a concentração de manitol a 1,0M foi utilizada. Após sete dias, esses autores classificaram como patogênicas as cepas que cresceram a pelo menos 37°C e 1M de manitol, e os cistos dos isolados que mantiveram sua viabilidade após a exposição a 52°C também foram considerados termotolerantes. Por sua vez, Killic et al (2004) submeteram suas amostras a 1M de manitol e a 37°C somente durante 96 horas; Alves et al (2012) utilizaram as concentrações de 0,5M, 1,0M e 1,5M de manitol e 30°C e 37°C por 120 horas, considerando somente a concentração de 1,5M e a temperatura de 37°C como indicativos de patogenicidade; e Walochnick et al (2000b) testaram a termotolerância de amostras clínicas e ambientais de *Acanthamoeba* nas temperaturas de 30°C, 34°C, 37°C, 40°C e 42°C, em um período de observação que durou duas semanas. Segundo esses autores, todos os isolados clínicos analisados cresceram a 42°C, enquanto que os ambientais cresceram somente entre 30°C e 40°C.

Considerando os aspectos acima, as temperaturas e as concentrações de manitol utilizadas neste trabalho se justificam pelo fato de que era esperado que diferenças de crescimento entre os isolados fossem observadas, principalmente entre os isolados clínicos e ambientais. E diante das inúmeras formas de interpretação dos resultados encontradas na literatura, optou-se por avaliar os ensaios de patogenicidade por meio de critério qualitativo, ou seja, determinação da presença ou da ausência de crescimento, como tem sido demonstrado em muitos estudos.

Cabe destacar que, embora os resultados obtidos neste trabalho apresentem consistências com que tem sido relatado na literatura, diante do exposto acima e levando em consideração que praticamente todos os isolados ambientais analisados apresentaram crescimento às condições consideradas como determinantes de patogenicidade, se faz necessário que outros ensaios sejam testados com o intuito de acessar de uma forma mais objetiva o potencial patogênico desses isolados. Dentre os ensaios propostos atualmente por diversos trabalhos no mundo todo, destacam-se aqueles que buscam relação entre patogenicidade de *Acanthamoeba* e efeito citopático, secreção de proteases e testes de virulência *in vivo*, que deverão, portanto, ser utilizados em experimentos futuros para avaliar o banco de cepas de *Acanthamoeba* formado a partir deste trabalho.

7 CONCLUSÃO

- Foram obtidos isolados de *Acanthamoeba* de amostras clínicas e de todos os ambientes pesquisados em Vitória e região metropolitana (ES). A demonstração da presença dessas amebas em diferentes tipos de habitats confirma a ubiquidade desse gênero na natureza, como tem sido relatado na literatura. No Brasil, este é o primeiro trabalho a relatar o isolamento de *Acanthamoeba* em água do mar e em água de inundação.
- A utilização da PCR para a identificação do gênero foi conclusiva, uma vez que todos os clones foram identificados como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* pela técnica. Além disso, o emprego da mesma associada a outro tipo de reação de amplificação, a reação da semi-nested PCR, possibilitou a confirmação de casos suspeitos de ceratite amebiana em situações em que não houve o crescimento da cultura. Sendo assim, esses dados poderão ser utilizados para o estabelecimento de um diagnóstico mais rápido, sensível e específico de ceratite por *Acanthamoeba* no Espírito Santo.
- Os isolados clonados foram classificados por meio da análise morfológica de seus cistos como pertencentes a dois grupos taxonômicos (I e II), sendo que a maioria apresentou características morfológicas do grupo II, o grupo mais comumente isolado de amostras ambientais e clínicas. Embora esta classificação seja imprescindível para a taxonomia de *Acanthamoeba*, as limitações impostas por ela, demonstradas neste trabalho pela impossibilidade de agrupamento de um isolado clonado, confirmam a necessidade da utilização de outros parâmetros para a classificação de *Acanthamoeba*.
- A classificação genotípica revelou que o genótipo T4 compreende a maioria dos isolados estudados, o que corrobora os dados da literatura sobre ser este o genótipo mais encontrado no ambiente e em isolados de ceratite amebiana. E este é o primeiro trabalho no Brasil que relata o isolamento de *Acanthamoeba* pertencente ao genótipo T1.
- Os ensaios de termotolerância e de osmotolerância, utilizados como marcadores de patogenicidade para a caracterização dos isolados clonados, demonstraram a possível presença de *Acanthamoeba* potencialmente patogênica em todos os ambientes estudados. No entanto, outros testes de patogenicidade devem ser realizados para

confirmar ou esclarecer o valor desses e de outros determinantes do potencial patogênico de *Acanthamoeba*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, N.; KIMATA, I. Genotyping of *Acanthamoeba* Isolates from Corneal Scrapings and Contact Lens Cases of *Acanthamoeba* Keratitis Patients in Osaka, Japan. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 63, p. 299-301, 2010.

ABELSON, M. R.; DEWEY-MATHIA, D. A.; SHAPIRO, A.; ANDOVER, N. *Acanthamoeba*: A Dangerous Pathogen. An in-depth look at the organism, how it causes keratitis and how patients can avoid infection. **Rev. Ophthalmol.**, 2008.

ADÉKAMBI, T.; SALAH, S. B.; KHLIF, M.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. Survival of Environmental Mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 72, p. 5974-5981, 2006.

ADL, S. M.; SIMPSON, A. G. B.; FARMER, M. A.; ANDERSEN, R. A.; ANDERSON, O. R.; BARTA, J. R.; BOWSER, S. S.; BRUGEROLLE, G.; FENSOME, R. A.; FREDERICQ, S.; JAMES, T. Y.; KARPOV, S.; KUGRENS, P.; KRUG, J.; LANE, C. E.; LEWIS, L. A.; LODGE, J.; LYNN, D. H.; MANN, D. G.; MCCOURT, R. M.; MENDOZA, L.; MOESTRUP, Ø.; MOZLEY-STANDRIDGE, S. E.; NERAD, T. A.; SHEARER, C. A.; SMIRNOV, A. V.; SPIEGEL, F. W.; TAYLOR, M. F. J. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 52, p. 399-451, 2005.

AICHELBURG, A. C.; WALOCHNIK, J.; ASSADIAN, O.; PROSCH, H.; STEUER, A.; PERNECZKY, G.; VISVESVARA, G. S.; ASPÖCK, H.; VETTER, N. Successful Treatment of Disseminated *Acanthamoeba* sp. Infection with Miltefosine. **Em. Infect. Dis.**, v. 14, p. 1743-1746, 2008.

AITKEN, D.; HAY, J.; KINNEAR, F. B.; KIRKNESS, C. M.; LEE, W. R.; SEAL, D. V. Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmanella* infection. **Ophtalmology**, v. 103, p. 485-494, 1996.

AKSOZEK, A.; MCCLELLAN, K.; HOWARD, K.; NIEDERKORN J.Y.; ALIZADEH, H. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* Cysts to Physical, Chemical, and Radiological Conditions. **J. Parasitol.**, v. 88, p. 621-623, 2002.

ALSAM, S.; KIM, K. S.; STINS, M.; RIVAS, A. O.; SISSONS, J.; KHAN, N. A. *Acanthamoeba* interactions with human brain microvascular endothelial cells. **Microb. Pathog.**, v. 35, p. 235-241, 2003.

ALVARENGA, L. S.; FREITAS, D.; HOFLING-LIMA, A. L. Ceratite por *Acanthamoeba*. **Arq. Bras. Oftal.**, v. 63, p. 155-159, 2000.

ALVES, D. S. M.; MORAES, A. S.; NITZ, N.; OLIVEIRA, M. G. C.; HECHT, M. M.; GURGEL-GONÇALVES, R.; CUBA, C. A. C. Occurrence and characterization of *Acanthamoeba* similar to genotypes T4, T5, and T2/T6 isolated from environmental sources in Brasília, Federal District, Brazil. **Exp. Parasitol.**, v. 131, p. 239-244, 2012.

ALVES J. M. P.; GUSMÃO C. X.; TEIXEIRA M. M. G.; 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*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 19-26, 2000.

ANDERSON, D.; SOO, S. S.; TOWLER, H. 1991. *Acanthamoeba* keratitis: experience in a non-specialist microbiology laboratory. **J. Clin. Pathol.**, v. 44, p. 699-700, 1991.

BACON, A. S.; FRAZER, D. G.; DART, J. K.; MATHESON, M.; FICKER, L. A.; WRIGHT, P. A review of 72 consecutive cases of *Acanthamoeba* keratitis, 1984-1992. **Eye**, v. 7, p. 719-725, 1993.

BADENOCH, P. R.; GRIMMOND, T. R.; CADWGAN, J.; DEAYTON, S. E.; ESSERY, M. S. L.; HILL, B. D. Nasal Carriage of Free-Living Amoebae. **Microb. Ecol. Health Dis.**, v. 1, p. 209-211, 1988.

BAGHERI, H. R.; SHAFIEI, R.; SHAFIEI, F.; SAJJADI, S. A. Isolation of *Acanthamoeba* Spp. from Drinking Waters in Several Hospitals of Iran. **Iran J. Parasitol.**, v. 5, p. 19-25, 2010.

BARBEAU, J.; BUHLER, T. Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. **Res. Microbiol.**, v. 152, p. 753-760, 2001.

BARETE, S.; COMBES, A.; DE JONCKHEERE, J. F.; DATRY, A.; VARNOUS, S.; MARTINEZ, V.; PTACEK, S. G.; CAUMES, E.; CAPRON, F.; FRANCÈS, C.; GIBERT, C.; CHOSIDOW, O. Fatal Disseminated *Acanthamoeba lenticulata* Infection in a Heart Transplant Patient. **Emer. Infect. Dis.**, v. 13, p. 736-738, 2007.

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

BAUER, R. W.; HARRISON, L. R.; WATSON, C. W.; STYER, E. L.; CHAPMAN, W. L. Isolation of *Acanthamoeba* sp. from a greyhound with pneumonia and granulomatous amebic encephalitis. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 5, p. 386-391, 1993.

BIDDICK, C. J.; ROGERS, L. H.; BROWN, T. J. Viability of Pathogenic and Nonpathogenic Free-Living Amoebae in Long-Term Storage at a Range of Temperatures. **App. Env. Microbiol.**, v. 48, p. 859-860, 1984.

BLOCH, K. C.; SCHUSTER, F. L. Inability To Make a Premortem Diagnosis of *Acanthamoeba* Species Infection in a Patient with Fatal Granulomatous Amebic Encephalitis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 3003-3006, 2005.

BOOST, M.; CHO, P.; LAI, S.; SUN, W. Detection of *Acanthamoeba* in Tap Water and Contact Lens Cases Using Polymerase Chain Reaction. **Optom. Vis. Sci.**, v. 85, p. 526-530, 2008.

BOOTON, G. C.; CARMICHAEL, J. R.; VISVESVARA, G. S.; BYERS, T. J.; FUERST, P. A. Genotyping of *Balamuthia mandrillaris* based on nuclear 18S and mitochondrial 16S rRNA genes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 68, p. 65-69, 2003.

BOOTON, G. C.; KELLY, D. J.; CHU, Y. W.; SEAL, D. V.; HOUANG, E.; LAM, D. S. C.; BYERS, T. J.; FUERST, P. A. 18S Ribosomal DNA Typing and Tracking of *Acanthamoeba* Species Isolates from Corneal Scrape Specimens, Contact Lenses, Lens Cases, and Home Water Supplies of *Acanthamoeba* Keratitis Patients in Hong Kong. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 1621-1625, 2002.

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. **J. Euk. Microbiol.**, v. 51, p. 192-200, 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. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 1689-1693, 2005.

BROWN, T. J.; CURSONS, R. T. M.; KEYS, E. A. Amoebae from Antarctic Soil and Water. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 44, p. 491-493, 1982.

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

CARVALHO, F. R. S.; CARRIJO-CARVALHO, L. C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; FORONDA, A. S.; FREITAS, D. Serine-like proteolytic enzymes correlated with differential pathogenicity in patients with acute *Acanthamoeba* keratitis. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, p. 603-609, 2011.

CARVALHO, F. R. S.; FORONDA, A. S.; MANNIS, M. J.; HÖFLING-LIMA, A. L.; BELFORT, R.; FREITAS, D. Twenty Years of *Acanthamoeba* Keratitis. **Cornea**, v. 28, p. 516-519, 2009.

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. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 103, p. 477-485, 2009.

CERVA L.; SERBUS C.; SKOCIL V. Isolation of limax amoebae from the nasal mucosa of man. **Folia Parasitol.**, v. 20, p. 97-103, 1973.

CHAGLA, A. H.; GRIFFITHS, A. J. Growth and Encystation of *Acanthamoeba castellanii*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 85, p. 139-145, 1974.

CHAN, L.; MAK, J.; LOW, Y.; KOH, T.; ITHOI, I.; MOHAMED, S. M. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* spp. from air-conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. **Acta Tropica**, v. 117, p. 23–30, 2011.

CHAPPELL, C. L.; WRIGHT, J. A.; COLETTA, M.; NEWSOME, A. L. Standardized Method of Measuring *Acanthamoeba* Antibodies in Sera from Healthy Human Subjects. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 8, p. 724-730, 2001.

CHÁVEZ-MUNGUÍA, B.; OMAÑA-MOLINA, M.; GONZÁLEZ-LÁZARO, M.; ARTURO GONZÁLEZ-ROBLES, A.; BONILLA, P.; ADOLFO MARTÍNEZ-PALOMO, A. Ultrastructural Study of Encystation and Excystation in *Acanthamoeba castellanii*. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 52, p. 153–158, 2005.

CHEW, H. F.; YILDIZ, E. H.; HAMMERSMITH, K. M.; EAGLE, R. C.; RAPUANO, C. J.; LAIBSON, P. R.; AYRES, B. D.; JIN, Y.; COHEN, E. J. Clinical Outcomes and Prognostic Factors Associated With *Acanthamoeba* Keratitis. **Cornea**, v. 30, p. 435–441, 2011.

CHOMICZ, L.; PADZIK, M.; GRACZYK, Z.; STAROSCIK, B.; GRACZYK, T. K.; NAPRAWSKA, A.; OLEDZKA, G.; SZOSTAKOWSKA, B. *Acanthamoeba castellanii*: *In vitro* effects of selected biological, physical and chemical factors. **Exp. Parasitol.**, v. 126, p. 103-105, 2010.

CHUNG D. I.; YU H. S.; HWANG M. Y.; KIM T. H.; KIM T. O.; YUN H. C.; KONG H. H. Subgenus classification of *Acanthamoeba* by riboprinting. **Korean J. Parasitol.**, v. 36, p. 69-80, 1998.

CLARKE, D. W.; ALIZADEH, H.; NIEDERKORN, J. Y. Failure of *Acanthamoeba castellanii* to Produce Intraocular Infections. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 46, p. 2472-2478, 2005.

CORSARO, D.; VENDITTI, D. More *Acanthamoeba* Genotypes: Limits to the Use of rDNA Fragments to Describe New Genotypes. **Acta Protozool.**, v. 50, p. 49-54, 2011.

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

COSTA, A. O.; CASTRO, E. A.; FERREIRA, G. A.; FURST, C.; CROZETA, M.A.; THOMAZ-SOCCOL, V. Characterization of *Acanthamoeba* Isolates from Dust of a Public Hospital in Curitiba, Paraná, Brazil. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 57, p. 70-75, 2010.

CÔTÉ, M. A.; IRVINE, J. A.; RAO, N. A.; TROUSDALE, M. D.; Evaluation of the Rabbit as a Model of *Acanthamoeba* Keratitis. **Rev. Infect. Dis.**, v. 13, p. 443-444, 1991.

COULON, C.; COLLIGNON, A.; MCDONNELL, G.; THOMAS, V. Resistance of *Acanthamoeba* Cysts to Disinfection Treatments Used in Health Care Settings. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, p. 2689-2697, 2010.

CULBERTSON, C. G.; SMITH, J. W.; COHEN, H. K.; MINNER, J. R. Experimental Infection of Mice and Monkeys by *Acanthamoeba*. **Am. J. Pathol.**, v. 35, p. 185-197, 1959.

DA ROCHA-AZEVEDO, B.; COSTA e SILVA-FILHO, F. Biological characterization of a clinical and an environmental isolate of *Acanthamoeba polyphaga*: analysis of relevant parameters to decode pathogenicity. **Arch. Microbiol.**, v. 188, p. 441-449, 2007.

DA ROCHA-AZEVEDO, B.; TANOWITZ, H. B.; MARCIANO-CABRAL, F. Diagnosis of Infections Caused by pathogenic Free-Living Amoebae. **Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.**, v. 2009, p. 1-14, 2009.

DART, J. K. G.; SAW, V. P. J.; KILVINGTON, S. *Acanthamoeba* Keratitis: Diagnosis and Treatment Update 2009. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 148, p. 487-499, 2009.

DECLERCK, P.; BEHETS, J.; VAN HOEF, V.; OLLEVIER, F. Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. **Water Res.**, v. 41, p. 3159-3167, 2007.

DE JONCKHEERE, J. F. A Century of Research on the Amoeboflagellate Genus *Naegleria*. **Acta Protozool.**, v. 41, p. 309-342, 2002.

DE JONCKHEERE, J. F. Growth Characteristics, Cytopathic Effect in Cell Culture, and Virulence in Mice of 36 Type Strains Belonging to 19 Different *Acanthamoeba* spp. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 39, p. 681-685, 1980.

DE JONCKHEERE J. F. Pathogenic free-living amoebae in swimming pools: survey in Belgium. **Ann. Microbiol.**, v. 130B, p. 205-212, 1979.

DENNEY, C. F.; IRAGUI, V. J.; UBER-ZAK, L. D.; KARPINSKI, N. C.; ZIEGLER, E. J.; VIVESVARA, G. S.; REED, S. L. Amebic meningoencephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris*: case report and review. **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, p. 1354-1358, 1997.

DHIVYA, S.; MADHAVAN, H. N.; RAO, C. M.; RAO, K. S.; RAMCHANDER, P. V.; THERESE, K. L.; MALATHI, J. Comparison of a novel semi-nested polymerase chain reaction (PCR) with a uniplex PCR for the detection of *Acanthamoeba* genome in corneal scrapings. **Parasitol. Res.**, v. 100, p. 1303-1309, 2007.

DIAZ, J. K. Increasing Intracerebral Infections Caused by Free-Living Amebae in the United States and Worldwide. **J. Neuroparasitol.**, v. 1, p. 1-10, 2010.

DI CAVE, D.; MONNO, R.; BOTTALICO, P.; GUERRIERO, S.; D'AMELIO, S.; D'ORAZI, C.; BERRILLI, F. *Acanthamoeba* T4 and T15 genotypes associated with keratitis infections in Italy. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 28, p. 607-612, 2009.

DUARTE, J. L.; FURST, C.; KLISIEWICZ, D. R.; KLASSEN, G.; COSTA, A. O. Genotypic identification and physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates from keratitis cases and domestic environment in Brazil. Artigo em processo de submissão. Data provável de publicação: 2013.

DUARTE, A. G.; SATTAR, F.; GRANWEHR, B.; ARONSON, J. F.; WANG, Z.; LICK, S. Disseminated Acanthamoebiasis after Lung Transplantation. **J. Heart Lung Transplant.**, v. 25, p. 237-240, 2006.

DUDLEY, R.; MATIN, A.; ALSAM, S.; SISSONS, J.; MAGHSOOD, A. H.; KHAN, N. A. *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 but not T7 encyst in response to increased osmolarity and cysts do not bind to human corneal epithelial cells. **Acta Trop.**, v. 95, p. 100-108, 2005.

FORONDA, A. S. Observações sobre Amebas de Vida Livre Potencialmente Patogênicas. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979.

FOUQUE, E.; TROUILHÉ, M.; THOMAS, V.; HARTEMANN, P.; RODIER, M.; HÉCHARDA, Y. Cellular, Biochemical, and Molecular Changes during Encystment of Free-Living Amoebae. **Eukaryot. Cell.**, v. 11, p. 392-387, 2012.

GALARZA, C.; GUTIÉRREZ, E.; URIBE, M.; RAMOS, W.; ORTEGA, A.; ÁVILA, J.; HANCCO, J.; ESPINOZA, Y.; ESPINOZA, M.; ÑAVIMCOPA, M.; GÁMEZ, D. Amebas de vida libre en lesiones cutáneas: reporte de 4 casos. **Derm. Peruana**, v. 16, p. 36-40, 2006.

GARATE, M.; MARCHANT, J.; CUBILLOS, I.; CAO, Z.; KHAN, N. A.; PANJWANI, N. In vitro pathogenicity of *Acanthamoeba* is associated with the expression of the mannose-binding protein. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 47, p. 1056-1062, 2006.

GAST, R. J. Development of an *Acanthamoeba* –specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 48, p. 609-615, 2001.

GAST, R. J.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. Discovery of group I introns in the nuclear small subunit ribosomal RNA genes of *Acanthamoeba*. **Nucl. Acid. Res.**, v. 22, p. 592-596, 1994.

GAST, R. J.; LEDEE, D. R.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 43, p. 498-504, 1996.

GERTISER, M. L.; VISCIARELLI, E.; BASABE, N.; PEREZ, M. J.; COSTAMAGNA, S. R. *Acanthamoeba* spp. en piscinas cubiertas de la ciudad de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. **Acta Bioquím. Clín. Latinoam.**, v. 44, p. 697-703, 2010.

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. **Exp. Parasitol.**, v. 121, p. 180-186, 2009.

GOLDSCHMIDT, P.; DEGORGÉ, S.; SAINT-JEAN, C.; YERA, H.; ZEKNINI, F.; BATELLIER, L.; LAROCHE, L.; CHAUMEIL, C. DNA extraction methods for the diagnosis of *Acanthamoeba*. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 93, p. 418, 2007.

GONZÁLEZ-ROBLES, A.; GONZÁLEZ-LÁZARO, M.; OMAÑA-MOLINA, M.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Acanthamoeba castellanii*: Endocytic Structures Involved in the Ingestion of Diverse Target Elements. **Acta Protozool.**, v. 48, p. 329-334, 2009.

GÓRNIK, K.; KUZANA-GRYGIEL, W. Presence of virulent strains of amphizoic amoebae in swimming pools of the city of Szczecin. **Ann. Agric. Environ. Med.**, v. 11, p. 233-236, 2004.

GREUB, G.; RAOULT, D. Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, p. 413-433, 2004.

GRIFFIN, J. L. Temperature Tolerance of Pathogenic and Nonpathogenic Free-living Amoebas. **Science**, v. 178, p. 869-870, 1972.

HE, Y.; MCCULLEY, J. P.; ALIZADEH, H.; PIDHERNEY, M.; MELLON, J.; UBELAKER, J. E.; STEWART, G. L.; SILVANY, R. E.; NIEDERKORN, J. Y. A Pig Model of *Acanthamoeba* Keratitis: Transmission Via Contaminated Contact Lenses. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 33, p. 126-133, 1992.

HE, Y.; NIEDERKORN, J. Y.; MCCULLEY, J. P.; STEWART, G. L.; MEYER, D. R.; SILVANY, R.; DOUGHERTY, J. In Vivo and In Vitro Collogolytic Activity of *Acanthamoeba castellanii*. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 31, p. 2235-2240, 1990.

HEWETT, M. K.; ROBINSON, B. S.; MONIS, P. T.; SAINT, C. P. Identification of a New *Acanthamoeba* 18S rRNA Gene Sequence Type, Corresponding to the Species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara, 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae). **Acta Protozool.**, v. 42, p. 325-329, 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*. **Environ. Microbiol.**, v. 1, p. 357-367, 1999.

HOWE, D. K.; VODKIN, M. H.; NOVAK, R. J.; VISVESVARA, G.; MCLAUGHLIN, G. L. Identification of two genetic markers that distinguish pathogenic and nonpathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. **Parasitol. Res.**, v. 83, p. 345-348, 1997.

ILLINGWORTH, C. D.; COOK, S. D.; KARABATSA, C. H.; EASTY, D. L. *Acanthamoeba* keratitis: risk factors and outcome. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 79, p. 1078-1082, 1995.

IM K.; SHIN H. *Acanthamoeba sohi*, n. sp., a pathogenic Korean isolate YM-4 from a freshwater fish. **Korean J. Parasitol.**, v. 41, p. 181-188, 2003.

IM, K.; SHIN, H.; SEO, D. W.; JEON, S.; KIM, T. Pathogenicity of Korean isolates of *Acanthamoeba* by observing the experimental infection and zymodemes of five isoenzymes. **Korean J. Parasitol.**, v. 37, p. 85-92, 1999.

INIT, I.; LAU, Y. L.; ARIN FADZLUN, A.; FOEAD, A. I.; NEILSON, R. S.; NISSAPATORN, V. Detection of free living amoebae, *Acanthamoeba* and *Naegleria*, in swimming pools, Malaysia. **Trop. Biomed.**, v. 27, p. 566-577, 2010.

JEONG, H. J.; YU, H. S. The role of domestic tap water in *Acanthamoeba* contamination in contact lens storage cases in Korea. **Korean J. Parasitol.**, v. 43, p. 47-50, 2005.

JOHN, D. T.; HOWARD, M. J. Seasonal distribution of pathogenic free-living amebae in Oklahoma waters. **Parasitol. Res.**, v. 8, p. 193-201, 1995.

JOHN, D. T.; HOWARD, M. J. Techniques for isolating thermotolerant and pathogenic freeliving amebae. **Folia Parasitol.**, v. 43, p. 267-271, 1996.

KAO, P. M.; HSU, B. M.; CHEN, N. H.; HUANG, K. H.; HUANG, S. W.; KING, K. L.; CHIU, Y. C. Isolation and identification of *Acanthamoeba* species from thermal spring environments in southern Taiwan. **Exp. Parasitol.**, v. 130, p. 354–358, 2012.

KENNEDY, S. M.; DEVINE, P.; HURLEY, C.; OOI, Y. S.; COLLUM, L. M. T. Corneal infection associated with *Hartmannella vermiformis* in contact-lens wearer. **Lancet**, v. 346, p. 637-638, 1995.

KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 30, p. 564-595, 2006.

KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: Biology and Pathogenesis. Norfolk: UK: **Caister Academic Press**, 2009.

KHAN, N. A.; JARROLL, E. L.; PAGET, T. A. *Acanthamoeba* Can Be Differentiated by the Polymerase Chain Reaction and Simple Plating Assays. **Curr. Microbiol.**, v. 43, p. 204-208, 2001.

KHAN, N. A.; JARROLL, E. L.; PAGET, T. A. Molecular and Physiological Differentiation Between Pathogenic and Nonpathogenic *Acanthamoeba*. **Curr. Microbiol.**, v. 45, p. 197–202, 2002.

KHAN, N. A.; JARROLL, E. L.; PANJWANI, N.; CAO, Z.; PAGET, T. A. Proteases as Markers for Differentiation of Pathogenic and Nonpathogenic Species of *Acanthamoeba*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 2858-2861, 2000.

KHAN, N. A.; TAREEN, N. K. Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and pathogenicity-based categorization of *Acanthamoeba* strains. **Folia Parasitol.**, v. 50, p. 97-104, 2003.

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

KILVINGTON, S. Moist-Heat Disinfection of *Acanthamoeba* Cysts. **Letters Appl. Bacteriol.**, v. 9, p. 187-189, 1989.

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. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 45, p. 165-169, 2004.

KIM, E. C.; KIM, M.S. Bilateral *Acanthamoeba* Keratitis After Orthokeratology. **Cornea**, v. 23, p. 348-350, 2009.

KINDE, H.; READ, D. H.; DAFT, B. M.; MANZER, M.; NORDHAUSEN, R. W.; KELLY, D. J.; FUERST, P. A.; BOOTON, G.; VISVESVARA, G. S. Infections caused by pathogenic free-living amebas (*Balamuthia mandrillaris* and *Acanthamoeba* sp.) in horses. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 19, p. 317-322, 2007.

KINDE, H.; VISVESVARA, G. S.; BARR, B. C.; NORDHAUSEN, R. W.; CHIU, P. H. W. Amebic meningoencephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris* (leptomyxid ameba) in a horse. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 10, p. 378-381, 1998.

KINGSTON, D.; WARHURST, D. C. Isolation of Amoebae From The Air. **J. Med. Microbiol.**, v. 2, p. 27-36, 1969.

KONG, H. H. Molecular Phylogeny of *Acanthamoeba*. **Korean J. Parasitol.**, v. 47, p. 21-28, 2009.

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. **Neurocrit. Care**, v. 12, p. 91-94, 2010.

LAM, D. S. C.; HOUANG, E.; FAN, D. S. P.; LYON, D.; SEAL, D.; WONG, E. Incidence and risk factors for microbial keratitis in Hong Kong: comparison with Europe and North America. **Eye**, v. 16, p. 608–618, 2002.

LEDEE, D. R.; IOVIENO, A.; MILLER, D.; MANDAL, N.; DIAZ, M.; FELL, J.; FINI M. E.; ALFONSO E. C. Molecular Identification of T4 and T5 Genotypes in Isolates from *Acanthamoeba* Keratitis Patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, p. 1458–1462, 2009.

LEHMANN, O. J.; GREEN, S. M.; MORLET, N.; KILVINGTON, S.; KEYS, M. F.; MATHESON, M. M.; DART, J. K. G.; MCGILL, J. I.; WATT, P. J. Polymerase Chain Reaction Analysis of Corneal Epithelial and Tear Samples in the Diagnosis of *Acanthamoeba* Keratitis. **IOVS.**, v. 39, p. 1261-1265, 1998.

LIU, H.; HA, Y.; LEE, S.; HONG, Y.; KONG, H.; CHUNG, D. Genetic diversity of *Acanthamoeba* isolates from ocean sediments. **Korean J. Parasitol.**, v. 44, p. 117-125, 2006.

LIU, H.; MOON, E.; YU, H.; JEONG, H.; HONG, Y.; KONG, H.; CHUNG, D. Evaluation of taxonomic validity of four species of *Acanthamoeba*: *A. divionensis*, *A. paratuberculosis*, *A. mauritaniensis*, and *A. rhyodes*, inferred from molecular analyses. **Korean J. Parasitol.**, v. 43, p. 7-13, 2005.

LLOVES, M.; LORES, B.; PASCUAL, S.; ARIAS, C.; PANIAGUA, E. Isolation of *Acanthamoeba* spp. in intensive aquaculture areas of Vigo estuary (NW, Spain). **Sci. Mar.**, v. 60, p. 549-551, 1996.

LLOYD, D.; MELLOR, H.; WILLIAMS, J. L. Oxygen affinity of the respiratory chain of *Acanthamoeba castellanii*. **Biochem. J.**, v. 214, p. 47-51, 1983.

LORENZO-MORALES, J.; MARTÍN-NAVARRO, C. M; MARTÍNEZ-CARRETERO, E.; PIÑERO, J. E.; VALLADARES, B. Encephalitis Due to Free Living Amoebae: An Emerging Issue in Human Health. **Non-Flavivirus Encephalitis**, p. 329-338, 2011.

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

LORENZO-MORALES, J.; MONTAVERDE-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. **Ann. Agric. Environ. Med.**, v. 12, p. 233-236, 2005b.

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. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, vol. 99, p. 751–758, 2005c.

LORENZO-MORALES, J.; LÓPEZ-DARIAS, M.; MARTÍNEZ-CARRETERO, E.; VALLADARES, B. Isolation of potentially pathogenic strains of *Acanthamoeba* in wild squirrels from the Canary Islands and Morocco. **Exp. Parasitol.**, v. 117, p. 74-79, 2007.

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 Trop.**, v. 100, p. 63–69, 2006.

MAGLIANO A. C. M. Diversidade de *Acanthamoeba* spp no Brasil: isolamento, aspectos fisiológicos, genotipagem e relações filogenéticas entre isolados de ambiente e de casos clínicos. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

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

MAGLIANO A. C. M.; TEIXEIRA, M. 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. **Parasitology**, v. 139, p. 45–52, 2012.

MAGNET, A.; GALVÁN, A. L.; FENOY, S.; IZQUIERDO, F.; RUEDA, C.; VADILLO, C. F.; PÉREZ-IREZÁBAL, J.; BANDYOPADHYAY, K.; VISVESVARA, G. S.; DA SILVA A. J.; DEL AGUILA, C. Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates. **Parasitol. Res.**, v. 111, p. 383-392, 2012.

MAGSHOOD, A. H.; SISSONS, J.; REZAIAN, M.; NOLDER, D.; WARHURST, D.; KHAN, N. A. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. **J. Med. Microbiol.**, v. 54, p. 755-759, 2005.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, p. 273-307, 2003.

MARCOMINI, L. A. G. Presença de *Acanthamoeba* na conjuntiva de nadadores hígidos. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Ribeirão Preto, São Paulo, 2009.

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

MARTINEZ, M. S.; GONZALEZ-MEDIERO, G.; SANTIAGO, P.; DE LOPE, A. R.; DIZ, J.; CONDE, C.; VIVESVARA, G. S. Granulomatous Amebic Encephalitis in a Patient with AIDS: Isolation of *Acanthamoeba* sp. Group II from Brain Tissue and Successful Treatment with Sulfadiazine and Fluconazole. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 3892–3895, 2000.

MATHERS, W. D.; NELSON, S. E.; LANE, J. L.; WILSON, M. E.; ALLEN, R. C.; FOLBERG, R. Confirmation of Confocal Microscopy Diagnosis of *Acanthamoeba* Keratitis Using Polymerase Chain Reaction Analysis. **Arch. Ophthalmol.**, v. 118, p. 178-183, 2000.

MEIER, P. A.; MATHERS, W. D.; SUTPHIN, J. E.; FOLBERG, R.; HWANG, T.; WENZEL, R. P. An Epidemic of Presumed *Acanthamoeba* keratitis that followed regional flooding. Results of a Case-Control Investigation. **Arch. Ophthalmol.**, v. 116, p. 1090-1094, 1998.

MORTAZAVI, P. N.; GOLDSWORTHY, G.; KIRK, R.; KHAN, N. A. *Acanthamoeba* produces disseminated infection in locusts and traverses the locust blood-brain barrier to invade the central nervous system. **BMC Microbiol.**, v. 10, p. 1-9, 2010.

MORTAZAVI, P. N.; GOLDSWORTHY, G.; KIRK, R.; KHAN, N. A. Novel model for the *in vivo* study of central nervous system infection due to *Acanthamoeba* spp. (T4 genotype). **J. Med. Microbiol.**, v. 58, p. 503–508, 2009.

MUÑOZ, V.; REYES, H.; TOCHE, P.; CÁRCAMO, C.; GOTTLIEB, B. Aislamiento de amebas de vida libre en piscinas públicas de Santiago de Chile. **Parasitol. Latinoam.**, v. 58, p. 106 – 111, 2003.

MUNSON, D. A.; PAGET, T. A. Distribution of *Acanthamoeba* in More and Less Polluted North Sea Coastal Sediments. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 53, p. 12-14, 2006.

NACAPUNCHAI, D.; KINO, H.; RUANGSITTICHA, C.; SRIWICHA, P.; ISHII, A.; TERADA, M. A Brief Survey of Free-living Amebae in Thailand and Hamamatsu District, Japan. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health.**, v. 32, p. 179-182, 2001.

NAGYOVÁ, V.; NAGY, A.; TIMKO, J. 2010. Morphological, physiological and molecular biological characterisation of isolates from first cases of *Acanthamoeba* keratitis in Slovakia. **Parasitol. Res.**, v. 106, p. 861–872, 2010.

NIYYATI, M.; LORENZO-MORALES, J.; RAHIMIC, F.; MOTEVALLI-HAGHI, A.; MARTÍN-NAVARRO, C. M.; FARNIA, S.; VALLADARES, B.; REZAEIAN, M. Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains from dust sources in Iran. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 103, p. 425-427, 2009.

NUPRASERT, W.; PUTAPORNTIP, C.; PARIYAKANOK, L.; JONGWUTIWES, S. Identification of a Novel T17 Genotype of *Acanthamoeba* from Environmental Isolates and T10 Genotype Causing Keratitis in Thailand. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, p. 4636–4640, 2010.

OBEID, W. N.; ARAÚJO, R.; VIEIRA, L. A.; MACHADO, M. A. C. Ceratite bilateral por *Acanthamoeba* – Relato de caso. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 66, p. 876-880, 2003.

OLIVA, S.; JANTZ, M.; TIERNAN, R.; COOK, D. L.; JUDSON, M. A. Successful Treatment of Widely Disseminated Acanthamoebiasis. **South. Med. J.**, v. 92, p. 55-57, 1999.

OMAÑA-MOLINA, M.; GONZÁLEZ-ROBLES A.; SALAZAR-VILLATORO L. I.; CRISTÓBAL-RAMOS A. R.; GONZÁLEZ-LÁZARO M.; SALINAS-MORENO E.; MÉNDEZ-CRUZ R.; SÁNCHEZ-CORNEJO M.; DE LA TORRE-GONZÁLEZ E.; MARTÍNEZ-PALOMO A. *Acanthamoeba castellanii*: Morphological analysis of the interaction with human cornea. **Exp Parasitol.**, v. 126, p. 73-78, 2010.

ORTEGA-RIVAS, A.; LORENZO-MORALES, J.; ALONSO, V.; ABREU, N. J.; FORONDA, P.; DEL CASTILLO, A.; VALLADARES, B. Random Amplified Polymorphic DNA Profiles as a Tool for the Identification of *Acanthamoeba divionensis*. **Curr. Microbiol.**, v. 47, p. 84-86, 2003.

OZKOC, S.; TUNCAY, S.; DELIBAS, S. B.; AKISU, C.; OZBEK, Z.; DURAK, I.; WALOCHNIK, J. Identification of *Acanthamoeba* genotype T4 and *Paravahlkampfia* sp. from two clinical samples. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, p. 392-396, 2008.

PAGE, F. C. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. (Culture Collection of Algae and Protozoa). Cumbria: England: **Freshwater Biological Association**, Ambleside, 1988.

PAGE, F. C. Marine Gymnamoebae. (Culture Centre of Algae and Protozoa). England: **Institute of Terrestrial Ecology**, Cambridge, 1983.

PASRICHA, G.; SHARMA, S.; GARG, P.; AGGARWAL, R. K. Use of 18S rRNA Gene-Based PCR Assay for Diagnosis of *Acanthamoeba* Keratitis in Non-Contact Lens Wearers in India. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 3206–3211, 2003.

PETRY, F.; TORZEWSKI, M.; BOHL, J.; WILHELM-SCHWENKMEZGER, T.; SCHEID, P.; WALOCHNIK, J.; MICHEL, R.; ZÖLLER, L.; WERHAHN, K. J.; BHAKDI, S.; LACKNER, K. J. Early Diagnosis of *Acanthamoeba* Infection during Routine Cytological Examination of Cerebrospinal Fluid. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 1903–1904, 2006.

PRESTON, T.M.; RICHARDS, H.; WOTTON, R.S. Locomotion and feeding of *Acanthamoeba* at the water-air interface of ponds. **FEMS Microbiol. Letters.**, v. 194, p. 143–147, 2001.

PUSSARD, M.; PONS, R. Morphology de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). **Protistologica**, v. 8, p. 557–598, 1977.

QVARNSTROM, Y.; SILVA, A. J.; SCHUSTER, F. L.; GELMAN, B. B.; VISVESVARA, G. S. Molecular Confirmation of *Sappinia pedata* as a Causative Agent of Amoebic Encephalitis. **J. Infect. Dis.**, v. 199, p. 1139–42, 2009.

RADFORD, C. F.; MINASSIAN, D. C.; DART, J. K. G. *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 86, p. 536–542, 2002.

RAHMAN, M.; ABD, H.; ROMLING, U.; SANDSTROM, G.; MÖLLBY, R. *Aeromonas*–*Acanthamoeba* interaction and early shift to a viable but nonculturable state of *Aeromonas* by *Acanthamoeba*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 104, p. 1449–1457, 2008.

REN, M.; WU, X. Evaluation of Three Different Methods to Establish Animal Models of *Acanthamoeba* Keratitis. **Yonsei Med. J.**, v. 51, p. 121–127, 2010.

REZAEIAN, M.; NIYYATI, M.; FARNIA, SH.; HAGHI, A. M. Isolation of *Acanthamoeba* Spp. from Different Environmental Sources. **Iranian J. Parasitol.**, v. 3, p. 44–47, 2008.

SALAZAR, H. C.; MOURA, H.; RAMOS, R. T. Isolamento de amebas de vida livre a partir de água mineral engarrafada. **Rev. Saúde Pública**, v. 16, p. 261–267, 1982.

SAWYER, T. K. Free-Living Pathogenic and Nonpathogenic Amoebae in Maryland Soils. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 1074-1077, 1989.

SAWYER, T. K. Marine Amoebae in Waters of Chincoteague Bay, Virginia: Ecological Significance of “Old” and “New” Species. **Va. J. Sci.**, v. 41, p. 433-440, 1990.

SAWYER, T. K.; LEWIS, E. J.; GALASSA, M.; LEAR, D. W.; O’MALLEY, M. L.; ADAMS, W. N.; GAINES, J. Pathogenic amoebae in ocean sediments near wastewater sludge disposal sites. **J. Wat. Pollut. Control Fed.**, v. 54, p. 1318-1325, 1982.

SAWYER T. K.; VISVESVARA G. S.; HARKE B. A. Pathogenic Amoebas from Brackish and Ocean Sediments, with a Description of *Acanthamoeba hatchetti*, n. sp. **Science**, v. 196, p. 1324-1325, 1977.

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. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 74, p. 5822–5831, 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 Subgenic 18S Ribosomal DNA PCR and Sequencing for Genus and Genotype Identification of *Acanthamoeba* from Humans with Keratitis and from Sewage Sludge. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 1903-1911, 2001.

SCHUSTER, F.L. Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 342-354, 2002.

SCHUSTER, F.L.; VISVESVARA, G. S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans animals. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, p. 1001-1027, 2004.

SEAL, D. V. *Acanthamoeba* keratitis update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. **Eye**, v. 17, p. 893–905, 2003.

SEAL D.; STAPLETON F.; DART J. Possible environmental sources of *Acanthamoeba* spp in contact lens wearers. **Brit. J. Ophthalmol.**, v. 76, p. 424-427, 1992.

SHARMA, S.; GARG, P.; RAO, G. N. Patient characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 84, p. 1103-1108, 2000.

SHENG, W.; HUNG, C.; HUANG, H.; LIANG, S.; CHENG, Y.; JI, D.; CHANG, S. Case Report: First Case of Granulomatous Amebic Encephalitis Caused by *Acanthamoeba castellanii* in Taiwan. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, p. 277-279, 2009.

SHI, W.; LIU, M.; GAO, H.; LI, S.; XIE, L. Perioperative treatment and prognostic factors for penetrating keratoplast in *Acanthamoeba* keratitis unresponsive to medical treatment. **Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.**, v. 247, p. 1383-1388, 2009.

SHOFF, M.E.; ROGERSON, A.; KESSLER, K.; SCHATZ, S.; SEAL D.V. Prevalence of *Acanthamoeba* and other naked amoebae in South Florida domestic water. **J. Water Health.**, v. 6, p. 99-104, 2008.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. **Parasit. Vectors.**, v. 5, p. 1-13, 2012.

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

SISSONS, J.; ALSAM, S.; JAYASEKERA, S.; KHAN, N. A. Ecto-ATPases of clinical and non-clinical isolates of *Acanthamoeba*. **Microb. Pathog.**, v. 37, p. 231-239, 2004.

SLATER, C. A.; SICKEL, J. Z.; VISVESVARA, G. S.; PABICO, R. C.; GASPARI, A. A. Brief report: successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* infection in an immunocompromised patient. **N. Engl. J. Med.**, v. 331, p. 85-87, 1994.

SMITH, S. N.; KHAN, J. A.; ARMSTRONG, R. A.; MOHINDRU, B.; PRINCE, M.; WHIPPS, J. M. *Acanthamoeba polyphaga* Trophozoite Binding of Representative Fungal Single Cell Forms. **Acta Protozool.**, v. 49, p. 289–30, 2010.

SPANAKOS, G.; TZANETOU, K.; MILTSAKAKIS, D.; PATSOULA, E.; MALAMOU-LADA, E.; VAKALIS, N. C. Genotyping of pathogenic *Acanthamoeba* isolated from clinical samples in Greece: report of a clinical isolate presenting T5 genotype. **Parasitol. Int.**, v. 55, p. 147-149, 2006.

SRIRAM, R.; SHOFF, M.; BOOTON, G.; FUERST, P.; VISVESVARA, G. S. Survival of *Acanthamoeba* Cysts after Desiccation for More than 20 Years. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 4045-4048, 2008.

STADEN, R.; JUDGE, D. P.; BONFIELD, J. K. Sequence assembly and finishing methods. **Methods Biochem. Anal.**, v. 43, p. 303-322, 2001.

STEINBERG, J. P.; RENE, J. P.; GALINDO, L.; KRAUS, E. S.; GHANEM, K. G. Disseminated Acanthamebiasis in a Renal Transplant Recipient with Osteomyelitis and Cutaneous Lesions: Case Report and Literature Review. **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, p. 43-49, 2002.

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. **J. Euk. Microbial.**, v. 45, p. 45-54. 1998.

STRATFORD, M. P.; GRIFFITHS, A. J. Variations in the Properties and Morphology of Cysts of *Acanthamoeba castellanii*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 108, p. 33-37, 1978.

SYAM, P. P.; NARENDHAN, R.; VAN DER HOEK, J. Persistent *Acanthamoeba* keratitis in a non-contact lens wearer following exposure to bird seed dust. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 89, p. 388-389, 2005.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Mol. Biol. Evol.**, v. 28, p. 2731–2739, 2011.

TAVARES, M.; COSTA, J. M. C.; CARPENTER, S. S.; SANTOS, L. A.; AFONSO, C.; AGUIAR, A.; PEREIRA, J.; CARDOSO, A. I.; SCHUSTER, F. L.; YAGI, S.; SRIRAM, R.; VISVESVARA, G. S. Diagnosis of First Case of *Balamuthia* Amoebic Encephalitis in Portugal by Immunofluorescence and PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 2660–2663, 2006.

TEIXEIRA, L. H.; ROCHA, S.; PINTO, R. M. F.; CASEIRO, M. M.; COSTA, S. O. P. Prevalence of Potentially Pathogenic Free-Living Amoebae from *Acanthamoeba* and *Naegleria* Genera in Non-Hospital, Public, Internal Environments from the City of Santos, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 13, p. 395-397, 2009.

THOMAS, V.; MCDONNELL, G.; DENYER, S. P.; MAILLARD, J. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 34, p. 231–259, 2010.

TSVETKOVA, N.; SCHILD, M.; PANAIOTOV, S.; KURDOVA-MINTCHEVA, R.; GOTTSTEIN, B.; WALOCHNIK, J.; ASPÖCK, H.; LUCAS, M. S.; MÜLLER, N. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. **Parasitol. Res.**, v. 92, p. 405–413, 2004.

TU, E. Y.; 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, p. 764-72, 2008.

VAN KLINK, F.; ALIZADEH, H.; HE, Y.; MELLON, J. A.; SILVANY, R. E.; MCCULLEY, J. P.; NIEDERKORN, J. Y. The Role of Contact Lenses, Trauma, and Langerhans Cells in a Chinese Hamster Model of *Acanthamoeba* Keratitis. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 34, p. 1937-1944, 1993.

VESALUOMA, M.; KALSO, S.; JOKIPII, L.; WARHURST, D.; PÖNKÄ, A.; TERVO, T. Microbiological quality in Finnish public swimming pools and whirlpools with special reference to free living amoebae: a risk factor contact lens wearers? **Br. J. Ophthalmol.**, v. 79, p. 178-181, 1995.

VIANNA, E. N.; COSTA, J. O.; SANTOS, C. K. S.; CURY, M. C.; SILVA, E. F.; COSTA, A. O.; GOMES, M. A. An alternative method for DNA extraction and PCR identification of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in fecal samples. **Parasitol.**, v. 136, p. 765-769, 2009.

VINCENT, A.; LA SCOLA, B.; PAPAIZIAN, L. Advances in Mimivirus Pathogenicity. **Intervirology.**, v. 53, p. 304–309, 2010.

VISVESVARA, G. S. Classification of *Acanthamoeba*. **Rev. Infect. Dis.**, v. 13, p. 369-372, 1991.

VISVESVARA, G. S. Free-Living Amebae as Opportunistic Agents of Human Disease. **J. Neuroparasitol.**, v. 1, p. 1-13, 2010.

VISVESVARA, G. S.; MARTINEZ, A. J.; SCHUSTER, F. L.; LEITCH, G. J.; WALLACE, S. V.; SAWYERS, T. K.; ANDERSON, M. Leptomyxid Ameba, a New Agent of Amebic Meningoencephalitis in Humans and Animals. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 2750-2756, 1990.

VISVESVARA G. S.; MIRRA S. S.; BRANDT F. H.; MOSS D. M.; MATHEWS H. M.; MARTIN A. J. Isolation of Two Strains of *Acanthamoeba castellanii* from Human Tissue and Their Pathogenicity and Isoenzyme Profiles. **J. Clin. Microbiol.**, v. 18, p. 1405-1412, 1983.

VISVESVARA, G. S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappina diploidea*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 50, p. 1-26. 2007.

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

VISVESVARA, G. S.; SCHUSTER, F. L.; MARTINEZ, A. J. *Balamuthia mandrillaris*, N.G. N. Sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 40, p. 504-514, 1993.

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*). **Vet. Parasitol.**, v. 170, p. 197-200, 2010.

VODKIN, M. H.; HOWE, D. K.; VISVESVARA, G. S.; McLAUGHLIN, G. L. Identification of *Acanthamoeba* at the Generic and Specific Levels Using the Polymerase Chain Reaction. **J. Eukar. Microbiol.**, v. 39, p. 378–385, 1992.

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. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 338–340, 2008.

WALOCHNIK, J.; HALLER-SCHÖBER, 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. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 3932-3936, 2000a.

WALOCHNIK, J.; OBWALLER, A.; ASPÖCK, H. Correlations between Morphological, Molecular Biological, and Physiological Characteristics in Clinical and Nonclinical Isolates of *Acanthamoeba* spp. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 4408-4413, 2000b.

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

WANG, X.; AHEARN, D. G. Effect of Bacteria on Survival and Growth of *Acanthamoeba castellanii*. **Curr. Microbiol.**, v. 34, p. 212-215, 1997.

WESTMORELAND, S. V.; ROSEN, J.; MACKEY, J.; ROMSEY, C.; XIA, D. L.; VISVESVERA, G. S.; MANSFIELD, K. G. Necrotizing meningoencephalitis and pneumonitis in a simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaque due to *Acanthamoeba*. **Vet. Pathol.**, v. 41, 398–404, 2004.

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

YERA, H.; ZAMFIR, O.; BOURCIER, T.; VISCOGLIOSI, E.; NOËL, C.; DUPOUY-CAMET, J.; CHAUMEIL, C. The genotypic characterisation of *Acanthamoeba* isolates from human ocular samples. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 92, p. 1139–1141, 2008.

YU, H.; HWANG, M.; KIM, T.; YUN, H.; KIM, T.; KONG, H.; CHUNG, D. Phylogenetic relationships among *Acanthamoeba* spp. based on PCR-RFLP analyses of mitochondrial small subunit rRNA gene. **Korean J. Parasitol.**, v. 37, p. 181–188, 1999.

ZANELLA, J.; COSTA, S. O. P.; ZACARIA, J.; ECHEVERRIGARAY, S. A Rapid and Reliable Method for the Clonal Isolation of *Acanthamoeba* from Environmental Samples. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 55, p. 1–6, 2012.

9 ANEXOS

ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Registro no CEP: 006/07)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1 – Identificação do Responsável pela execução da pesquisa:

Título:

ISOLAMENTO DE AMOSTRAS DE AMEBAS DE VIDA LIVRE EM VITÓRIA – ESPÍRITO SANTO

Coordenador do Projeto:

Prof.^a Dr.^a Cinthia Furst Leroy Gomes

Telefones de contato do Coordenador:

27 3335 7295

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como objetivo determinar a ocorrência de amebas de vida livre em córnea, principalmente de usuários de lentes de contato. Antes de aceitar participar da pesquisa, leia atentamente as explicações abaixo que informam sobre o projeto.

Você poderá recusar a participar da pesquisa e poderá abandonar o procedimento em qualquer momento, sem nenhuma penalização ou prejuízo. Durante o projeto, você poderá recusar a responder qualquer pergunta que por ventura lhe causar algum constrangimento.

A sua participação como voluntário, ou a do menor pelo qual você é responsável, não te dará nenhum privilégio, seja ele de caráter financeiro ou de qualquer natureza, podendo se retirar do projeto em qualquer momento sem prejuízo a você ou ao menor.

Serão garantidos o sigilo e privacidade, sendo reservado ao participante ou seu responsável o direito de omissão de sua identificação ou de dados que possam comprometer-lo. Na apresentação dos resultados não serão citados os nomes dos participantes.

A sua participação ou a do menor sob sua responsabilidade não envolve seguintes riscos. Será coletado material das lentes de contato e das suas córneas por um especialista para verificar a presença de amebas. Também poderão ser realizadas perguntas relacionadas ao hábito de imersão em águas (como nadar em piscinas, por exemplo) e sobre como é manipulada a lente de contato (se for o caso).

Confirmo ter conhecimento do conteúdo deste termo. A minha assinatura abaixo indica que concordo em participar desta pesquisa e por isso dou meu consentimento. Também autorizo a participação do menor _____ sob minha responsabilidade.

_____, ____ de ____ de ____.

Assinatura do participante: _____.

Assinatura do pesquisador: _____.

ANEXO 2 - Meio de Cultura e Soluções

Meio ágar soja (FORONDA, 1979)

REAGENTES	QUANTIDADES
Farinha de soja	2,0g
Ágar bacteriológico	15,0g
H ₂ O destilada q.s.p	1000 ml

Preparo:

- 1) Dissolver a farinha de soja na água destilada e deixar em repouso por 24 horas.
- 2) Filtrar a infusão em papel filtro.
- 3) Acrescentar o ágar bacteriológico à solução filtrada.
- 4) Autoclavar a solução a 121°C por 15-20 min.
- 5) Distribuir o meio antes do resfriamento em placas de Petri esterilizadas (100 x 15 mm).
- 6) Após a solidificação do meio, selar as placas com PVC e armazenar em geladeira a 4°C.

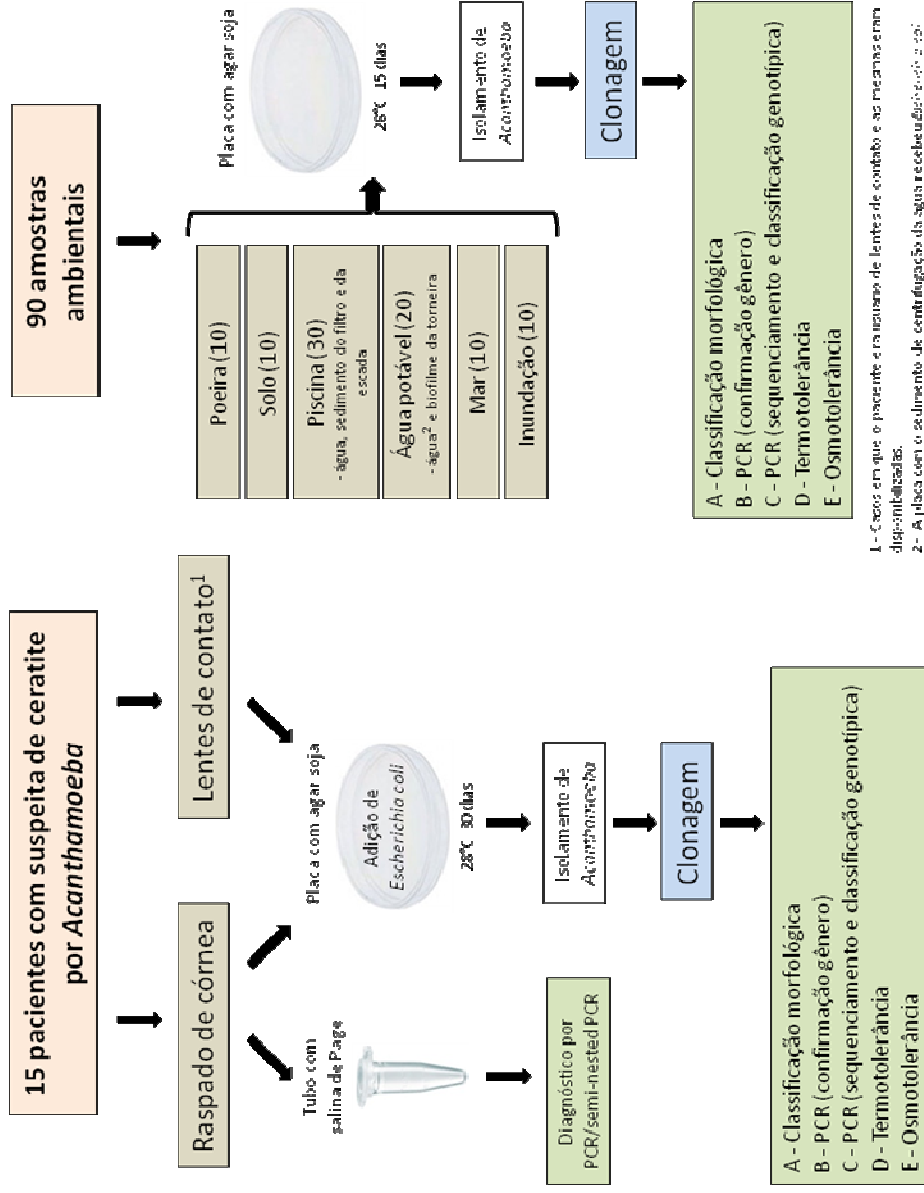
Salina de Page (PAGE, 1988)

REAGENTES	QUANTIDADES
Cloreto de sódio (NaCl)	1,20g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	0,04g
Cloreto de cálcio (CaCl ₂ x 2H ₂ O)	0,04g
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	1,42g
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	1,36g
H ₂ O destilada	1500 ml

Preparo:

- 1) Preparar soluções estoque de cada reagente em 100 ml de água destilada.
- 2) Misturar 10 ml de cada solução estoque e completar com água destilada até 1000 ml.
- 4) Autoclavar a solução a 121°C por 15-20 min.
- 5) Distribuir aproximadamente 5 ml da salina em tubos esterilizados e armazenar em geladeira a 4°C.

ANEXO 3 - Fluxograma de procedimentos para isolamento, classificação morfológica, identificação molecular, classificação genotípica e realização de ensaios de patogenicidade em isolados clínicos e ambientais de *Acanthamoeba*.



ANEXO 4 - Protocolo de extração de DNA do kit *ChargeSwitch® gDNA Micro Tissue* (Invitrogen®)

- 1) Adicionar ao tubo contendo a amostra 1 ml da solução de lise previamente preparada (1 ml do tampão de lise *ChargeSwitch® Lysis Buffer* e 10µl de Proteinase K).
- 2) Homogeneizar em *vortex* durante 10-15seg.
- 3) Incubar a 55°C por 2 horas (homogeneizar mais três vezes durante este período, em intervalos de 30 min).
- 4) Adicionar 5 µl de RNase A.
- 5) Homogeneizar por aspiração e instilação com auxílio de uma pipeta de 1000 µl.
- 6) Incubar à temperatura ambiente por 5 min.
- 7) Adicionar 200 µl do tampão de purificação *ChargeSwitch® Purification Buffer* e homogeneizar novamente por aspiração e instilação.
- 8) Adicionar 40 µl da suspensão de esferas magnéticas *ChargeSwitch® Magnetic Beads* (previamente homogeneizada em *vortex*).
- 9) Homogeneizar vagorosamente com auxílio de pipeta (1000 µl).
- 10) Incubar à temperatura ambiente por 1 min.
- 11) Colocar na estante magnética MagnaRack® (Invitrogen®) até a formação do sedimento.
- 12) Remover o sobrenadante cuidadosamente (com o tubo ainda na estante magnética).
- 13) Retirar da MagnaRack® e acrescentar 1 ml do tampão de lavagem *ChargeSwitch® Wash Buffer*.
- 14) Homogeneizar por aspiração e instilação.
- 15) Colocar novamente na estante magnética.
- 16) Após a formação do sedimento, descartar o sobrenadante (com o tubo ainda na estante magnética).
- 17) Retirar da MagnaRack® e acrescentar novamente 1 ml do tampão de lavagem *ChargeSwitch® Wash Buffer*.
- 18) Homogeneizar, colocar na estante magnética e descartar o sobrenadante (após a formação do sedimento e com o tubo ainda na estante magnética).
- 19) Adicionar 150 µl do tampão de eluição *ChargeSwitch® Elution Buffer*.
- 20) Homogeneizar com auxílio de uma pipeta de 1000 µl.
- 21) Incubar à temperatura de 55°C por 5 min (homogeneizar mais uma vez na metade do tempo de incubação).
- 22) Colocar na estante magnética até a formação do sedimento.
- 23) Transferir o volume eluído (contendo DNA) para outro tubo esterilizado.

ANEXO 5 - Protocolo de extração de DNA pela técnica de lise alcalina modificado de Vianna et al, 2009

- 1) Adicionar ao tubo contendo a amostra 200 µl de tampão de lise (glicose 50 mM, Tris HCl 25 mM pH 8, EDTA 10mM).
- 2) Homogeneizar e incubar à temperatura ambiente por 5 min.
- 3) Adicionar 10 µl de proteinase K (20 mg/ml) e homogeneizar.
- 4) Incubar a 55°C durante 1 hora e 30 min.
- 5) Acrescentar 400 µl de NaOH 0,2 M com 1% de SDS e homogeneizar.
- 6) Congelar em freezer e descongelar a 99°C três vezes.
- 7) Incubar em gelo por 5 min.
- 8) Adicionar 300 µl de acetato de amônio 7,5 M.
- 9) Homogeneizar vigorosamente e incubar em gelo por 20 min.
- 10) Centrifugar a 6000 xg por 5 min.
- 11) Transferir aproximadamente 700 µl do sobrenadante para outro tubo esterilizado.
- 12) Adicionar ao novo tubo 600 µl de isopropanol.
- 13) Incubar em freezer durante 15 min.
- 14) Centrifugar a 6000 xg por 15 min e descartar o sobrenadante.
- 15) Adicionar 500 µl de etanol 70%.
- 16) Centrifugar a 6000 xg por 5 min e descartar o etanol.
- 17) Deixar o tubo aberto e invertido à temperatura ambiente *overnight*.
- 18) Após a secagem, adicionar 50 µl de solução esterilizada de tampão TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM).

ANEXO 6 - Protocolo de purificação de produto de PCR do *kit GenElute® PCR Clean-Up* (Sigma-Aldrich®)

- 1) Colocar a coluna contendo a membrana de sílica dentro do tubo de coleta.
- 2) Adicionar à coluna 500 µl da solução de preparação *GenElute® Column Preparation Solution*.
- 3) Centrifugar a 12.000 xg durante 1 min.
- 4) Retirar a coluna do tubo, descartar o volume eluído e colocá-la novamente no tubo de coleta.
- 5) Adicionar a mistura previamente preparada de 50 µl do produto de PCR e 250 µl da solução de ligação *GenElute® Binding Solution*.
- 6) Centrifugar a 16.000 xg por 1min.
- 7) Retirar a coluna do tubo, descartar o eluato e recolocá-la dentro do tubo.
- 8) Adicionar 500 µl da solução de lavagem *GenElute® Wash Solution*.
- 9) Centrifugar a 16.000 xg por 1 min.
- 10) Retirar a coluna do tubo, descartar novamente o produto da eluição e recolocar a coluna no tubo de coleta.
- 11) Centrifugar a 16.000 xg durante 2 min.
- 12) Descartar o tubo de coleta e transferir a coluna para outro tubo de coleta.
- 13) Adicionar ao centro da coluna 50 µl da solução de eluição *GenElute® Elution Solution*.
- 14) Incubar à temperatura ambiente por 1 min.
- 15) Centrifugar a 16.000 xg durante 2 min.
- 16) Descartar a coluna e armazenar o volume eluído no tubo (contendo DNA).

ANEXO 7 - Sequências nucleotídicas dos isolados clínicos de *Acanthamoeba* determinadas pelo sequenciamento parcial do gene 18S rDNA.

ISOLADOS ^a	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA
AAO-1	AAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGAT AATGGAATAGGACCCTGTCCTCTATTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGA TTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTTATGAAA GATTAACCTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACG TTGAATACAAAACACCACCATCGGTGCGGTGTCCTTGGCGCGTTGGTCTTCAAAAGCCAGCGCG CGGGGGCGGCTTAGCCCGGTGGCACCGGTGAATGACTCCCTAG
ZCS-1	AAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGA TAATGGAATAGGACCCTGTCCTCTATTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAAT GATTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTTATG AAAGATTAACTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGG GGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGG AGACGTTGAATACAAAACACCACCATCGGTGCGGTGTCCTTGGCGTCGGTTTCGGCCGGCGCG GGGGCGGCTTAGCCCGGTGGCACCGGTGAATGACTCCC-TAGCAGTCTTGTGAGAATGT
RNM OD-1	TCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCTATTTTC AGTTGGTTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATT TAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTATGAAAGATTAACTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGG ATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTA ACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACGTTGAATACAAAACACCACCATCGGGCGCGGT CGTCCTTGGCGTTGTGCGGCTTACGGCTGGCGGCGCGAGGGCGGTTTAGCCCGGTGGCACCGGTG AATGACTCCCTAG
RNM LD-1	AAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGAT AATGGAATAGGACCCTGTCCTCTATTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGA TTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTTATGAAA GATTAACCTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACG TTGAATACAAAACACCACCATCGGCGCGGTGTCCTTGGCGTTGTGCGGTTTACGGCTGGCGGCG CGAGGGCGGTTTAGCCCGGTGGCACCGGTGAATGACTCCCC

^a **AAO-1, ZCS-1 e RNM OD-1:** isolados clínicos de pacientes com ceratite amebiana; **RNM LD-1:** isolado da lente de contato do paciente RNM OD-1.

ANEXO 8 - Sequências nucleotídicas dos isolados ambientais de *Acanthamoeba* determinadas pelo sequenciamento parcial do gene 18S rDNA.

(continua)

ISOLADOS ^a	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA
R₂P₁-1	AAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATTTTACCATTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGA TAATGGAATAGGACCCTGTCTCTATTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCAGGACTAGGGTAATGA AGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTTGGATTTATGAAAGATTA ACTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG ACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACGTTGAAT ACAAAACACCACCATCAGGCAGTGGGGTCGTCTCGCTTTTCCGGCAACGGGAAGTGGAGGC GGTCTCATTCCCCTGATGGCCCGGTGAATGACTCCC-TCGCAGCTTGTGAGA
R₃P₂-1	AAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGAT AATGGAATAGGACCCTGTCTCTATTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCAGGACTAGGGTAATGA TTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTTGGATTTATGAAA GATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACG TTGAATACAAAACACCACCATCGGCGCGGTCTGCTTGGCGTCTCGGTCCTTACGGGGCCGGGG CGCGGGGGCGGCTTAGCCCGGTGGCACCAGGTGAATGACTCCCTAG
R₃P₂-2	AAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGAT AATGGAATAGGACCCTGTCTCTATTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCAGGACTAGGGTAATGA TTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTTGGATTTATGAAA GATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACG TTGAATACAAAACACCACCATCGGCGCGGTCTGCTTGGCGTCTCGGTCCTTACGGGGCCGGGG CGCGGGGGCGGCTTAGCCCGGTGGCACCAGGTGAATGACTCCC- TAGCAGCTTGTGAGAAATTTTTTTTTT
A₂P₂-1	AAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGAT AATGGAATAGGACCCTGTCTCTATTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCAGGACTAGGGTAATGA TTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTTGGATTTATGAAA GATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACG TTGAATACAAAACACCACCATCGGTTGCGGTCTGCTTGGCGTCTCGGTTTCGGCCGGGGCGCG GGATGGTTTAGCCCGGTGGCACCAGGTGAATGACTCCC-TAGCAGCTTGTGAGAA
A₂P₂-1	AAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGAT AATGGAATAGGACCCTGTCTCTATTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCAGGACTAGGGTAATGA TTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTTGGATTTATGAAA GATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACG TTGAATACAAAACACCACCATCGGTTGCGGTCTGCTTGGCGTCTCGGTTTCGGCCGGGGCGCG GGACGGTTTAGCCCGGTGGCACCAGGTGAATGACTCCC-TAGCAGCTTGTGAGAAAT
P₁P₂-2	AAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGA TAATGGAATAGGACCCTGTCTCTATTTTCAGTTGGTTTTGGCAGCGCAGGACCAGGGTAATGA ATTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTTGGATTTATGA AAGATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGG GATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGA GACGTTGAATACAAAACACCACCATCGGTGCGGTCTGCTTGGCGGTCTCGGCTTGGCGTGGC GTGCGAGGGCGGTTTAGCCTGATGGCATCGGTGAATGACTCCC-TAGCAGCTTGTGA
P₄P₂-1	AAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTCTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGAT AATGGAATAGGACCCTGTCTCTATTTTCAGTTGGTTTTGACACGCGAGGACCAGGGTAATGAT TAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTTGGATTTATGAAA ATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGAT GAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCCACCAGCGATTAGGAGACGTT GAATACAAAACACCACCATCGGTGCGGTCTGCTTGGCATTTGTCGTGGCGCAAGTACGGCAGG TGTGAGGATGGTTTAGCCTGATGGATTCGGTGAATGACTCCCTAGC

^a R₂P₁-1, R₃P₂-1e R₃P₂-2: isolados de poeira; A₂P₂-1 e A₂P₂-2: isolados de solo; P₁P₂-2 e P₄P₂-1: isolados de piscina.

ANEXO 8 - Sequências nucleotídicas dos isolados ambientais de *Acanthamoeba* determinadas pelo sequenciamento parcial do gene 18S rDNA.

(conclusão)

ISOLADOS ^a	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA
M9-2	ATCCAATTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGATAATGGAATAGGACCCTGTCTCTCTATTTT CAGTTGGTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATAT TTAATTGTCAGAGGTGAAATTTCTGGATTTATGAAAGATTAACTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAG GATGTTTTCTTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTT AACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACGTTGAATACAAAACACCACCATCGGCGCGG TCGTCTTGGCGTCTCGGTCTTACGCGGGCCGGGCGCGGGGCGGCTTAGCCCGGTGG
M10-1	AAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGAT AATGGAATAGGACCCTGTCTCTCTATTTTTCAGTTGGTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGA TTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTTCTTGGATTTATGAAA GATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACG TTGAATACAAAACACCACCATCGGTTGCGGTCGTCTTGGCGTCTCGGTTTCGGCCGGGGCGCGG GGATGGCTTAGCCCGGTGGCACCGGTGAATGACTCCCCTAGCAGCT
M10-2	AAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGAT AATGGAATAGGACCCTGTCTCTCTATTTTTCAGTTGGTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGA TTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTTCTTGGATTTATGAAA GATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACG TTGAATACAAAACACCACCATCGGTTGCGGTCGTCTTGGCGTCTCGGTTTCGGCCGGGGCGCGG GGATGGCTTAGCCCGGTGGCACCGGTGAATGACTCCCCTAGCAGCT
RA₁P₂-2	AAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGAT AATGGAATAGGACCCTGTCTCTCTATTTTTCAGTTGGTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGA TTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTTCTTGGATTTATGAAA GATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACG TTGAATACAAAACACCACCATCGGTTGCGGTCGTCTTGGCGGTTGGTCTTCAAAGCCAGCGCGG GGGTGGCTTAGCCCGGTGGCACCGGTGAATGACTCCC-TAGCAGCTTGTGAGA
I1-1	AAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGAT AATGGAATAGGACCCTGTCTCTCTATTTTTCAGTTGGTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGA TTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTTCTTGGATTTATGAAA GATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACG TTGAATACAAAACACCACCATCGGCGCGGTTGTCTTGGCGGTTGGTCTGCGCTTGCAAAA
I1-2	AAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGA TAATGGAATAGGACCCTGTCTCTCTATTTTTCAGTTGGTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGA GATTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTTCTTGGATTTATG AAAGATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGG GGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGG AGACGTTGAATACAAAACACCACCATCGGCGCGGTTGTCTTGGCGGTTGGTCTGCGCTTGCAA AAGGGGGCGGCTTAGCCCGGTGGCACCGGTGAATGACTCCCCTA
I2-1	AAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGAT AATGGAATAGGACCCTGTCTCTCTATTTTTCAGTTGGTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGA TTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTTCTTGGATTTATGAAA GATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACG TTGAATACAAAACACCACCATCGGTTGCGGTCGTCTTGGCGCGGTTGGTCTTCAAAGCCAGCGCG CGGGGGCGGCTTAGCCCGGTGGCACCGGTGAATGACTCCCCTAGCAGCTT
I2-2	AAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCAGATCCAATTTTCTGCCACCGAATACATTAGCATGGGAT AATGGAATAGGACCCTGTCTCTCTATTTTTCAGTTGGTTTGGCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGA TTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAATTGTCAGAGGTGAAATTTCTTGGATTTATGAAA GATTAACCTTCTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGAT CGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACGATGCCGACCAGCGATTAGGAGACG TTGAATACAAAACACCACCATCGGTTGCGGTCGTCTTGGCGCGGTTGGTCTGCTTGAAGCCAGCGCG CGGGGGCGGCTTAGCCCGGTGGCACCGGTGAATGACTCCCCTA

^a M9-2, M10-1 e M10-2: isolados de mar; RA₁P₂-2: isolado de torneira; I1-1, I1-2, I2-1 e I2-2: isolados de inundação.

