

DANIELLA DE SOUSA MENDES MOREIRA ALVES

Isolamento e caracterização morfológica de Amebas de Vida Livre em amostras de solo e água de piscina no Distrito Federal.

Brasília, 2006

DANIELLA DE SOUSA MENDES MOREIRA ALVES

Isolamento e caracterização morfológica de Amebas de Vida Livre em amostras de solo e água de piscina no Distrito Federal.

Universidade de Brasília - UnB  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
Orientador: Prof. Dr. César Augusto Cuba Cuba  
Faculdade de Ciências da Saúde

Brasília, 2006

DANIELLA DE SOUSA MENDES MOREIRA ALVES

Isolamento e caracterização morfológica de Amebas de Vida Livre em amostras de solo e água de piscina no Distrito Federal.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador:  
Prof. Dr. César Augusto Cuba Cuba .

Brasília, 2006

*“Ora, ao Rei eterno, imortal, invisível, ao único Deus, seja honra e glória para todo o sempre. Amém.”*  
*(I Timóteo 1:17)*

*Ao meu amado esposo, Luciano Moreira Alves, companheiro e inspiração.*

*Aos meus pais, José Mendes de Sousa e Valdina de Souza Almeida, exemplos de vida e honestidade.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida, saúde e oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Professor Orientador Dr. César Augusto Cuba Cuba, pela paciência e dedicação na orientação deste trabalho.

À Capes, pela Bolsa de Mestrado que tanto contribuiu para o desenvolvimento deste projeto.

Aos professores doutores componentes da Banca Examinadora, pela gentileza na aceitação do convite.

Ao Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina da UnB, por disponibilizar os recursos necessários à realização do trabalho.

À Lourdinha, querida amiga e técnica do Laboratório de Parasitologia, pela contribuição ao trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia, Daniella Barreto, Rodrigo, Jaqueline e Jônatas, pelo apoio prestado.

À Professora Dra. Annette Silva Foronda, da Universidade de São Paulo, pela atividade de treinamento tão importante para este trabalho.

Ao Professor Dr. Albino Verçosa de Magalhães, pelo auxílio durante a documentação fotográfica no Laboratório de Patologia da UnB.

Ao Bráulio, técnico do Laboratório de Patologia da UnB, pela colaboração com o trabalho.

À Professora Dra. Sônia Nair Bão, pelo auxílio durante a documentação fotográfica no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB.

À Shirley, técnica do Laboratório de Imunologia, pela colaboração com o trabalho.

Às meninas da Secretaria de Pós- Graduação em Ciências da Saúde pela atenção e apoio.

Aos estabelecimentos que autorizaram a coleta das amostras, pela gentileza e compreensão.

Ao meu amado esposo, Luciano Moreira Alves, pelo apoio imensurável, compreensão e ajuda.

Aos meus pais, José Mendes de Sousa e Valdina de Souza Almeida por terem me inspirado nos estudos através de seus exemplos de vida e honestidade.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o bom e fiel desempenho deste trabalho.

## ÍNDICE

---

<b>RESUMO</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. Considerações gerais	1
1.2. Classificação Taxonômica	2
1.3. Gênero <i>Acanthamoeba</i>	3
1.4. Gênero <i>Naegleria</i>	6
1.5. Gênero <i>Balamuthia</i>	7
1.6. Gênero <i>Sappinia</i>	8
1.7. Ciclo Biológico	9
1.8. Comparações entre os quatro gêneros de Amebas de Vida Livre patogênicas	10
1.9. Caracterização morfológica	11
1.10. Isolamento Ambiental	11
1.10.1. No Mundo	11
1.10.2. No Brasil	12
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
2.1. Geral	13
2.2. Específicos	13
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>14</b>
3.1. Fontes de Isolamento das amebas	14
3.2. Meio de cultura	14
3.3. Isolamento primário de amebas de vida livre de piscinas:	15
3.3.1. Coleta	15
3.3.2. Semeadura	15
3.3.3. Temperatura de incubação	16
3.4. Isolamento primário no solo	16
3.4.1. Coleta	16
3.4.2. Semeadura	16
3.4.3. Temperatura de incubação	16
3.5. Desenvolvimento em meio de cultura	17
3.6. Seleção dos isolados	17
3.7. Biometria	17
3.8. Classificação morfológica	18
3.9. Teste de flagelação	18
3.10. Documentação Fotográfica	18
3.11. Manutenção das culturas	19

<b>4. RESULTADOS</b>	<b>20</b>
4.1. Isolamento primário em piscinas e seleção dos isolados	20
4.2. Isolamento primário no solo e seleção dos isolados	20
4.3. Origem dos isolados	23
4.4. Desenvolvimento em meio de cultura	23
4.5. Biometria	23
4.6. Classificação morfológica	23
4.7. Teste de flagelação	24
4.8. Documentação Fotográfica	24
4.8.1. Formas evolutivas do gênero <i>Acanthamoeba</i>	25
4.8.2. Formas evolutivas dos gêneros <i>Naegleria</i> e <i>Vannella</i>	31
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>36</b>
<b>6. COMENTÁRIOS FINAIS</b>	<b>45</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>46</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>47</b>
<b>9. ANEXO I: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	<b>55</b>
<b>10. ANEXO II: RESUMO APRESENTADO NA I JORNADA CIENTÍFICA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UnB</b>	<b>57</b>

---

# TÍTULO: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE AMEBAS DE VIDA LIVRE EM AMOSTRAS DE SOLO E ÁGUA DE PISCINA NO DISTRITO FEDERAL

## RESUMO

As amebas de vida livre são protozoários unicelulares encontrados tanto em solo úmido quanto em ambientes aquáticos. Desenvolvem-se no meio ambiente em solo, poeira e ar; em locais com água sem movimentação, em piscinas, lagos e represas; em soluções de limpeza de lentes de contato; em esgotos, unidades de ar-condicionado, aquecimento e ventilação. Os gêneros com relevância em Saúde Pública são *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* e, mais recentemente, *Sappinia*. Considerando o reconhecido impacto em Saúde Pública, foi feito um levantamento em Brasília (Distrito Federal) para determinar a presença em amostras ambientais principalmente dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*. Os ambientes de procedência das amostras foram piscinas ao ar livre e solo de jardins. Foram coletadas 34 amostras de piscinas e 15 de solo para tentativas de isolamento dos dois gêneros. Observações a fresco das amostras previamente concentradas e culturas “in vitro” foram realizadas. As amostras positivas para o gênero *Acanthamoeba* foram submetidas à classificação nos grupos I, II e/ou III de Pussard & Pons (1977). Os cistos dos dois gêneros foram medidos ao microscópio óptico de luz incidente calibrado com ocular micrométrica e aumento de 1000 vezes. As formas evolutivas foram documentadas na caracterização fenotípica. De acordo com a presença de maior quantidade de formas evolutivas, 13 isolados foram selecionados dentre as amostras positivas para *Acanthamoeba spp* e *Naegleria spp* e nomeados em UnB 1 a UnB 13. Os isolados UnB 1 a UnB 6 foram originados de amostras de piscinas e os isolados UnB 7 a UnB 13, de solo. Todos os isolados exibiram uma alta e eficiente proliferação em meio de cultura não definido, *ágar – soja*, a 25°C. Foram identificadas fenotipicamente, dentre os isolados, 8 (61%) amostras positivas para *Acanthamoeba* com morfologia similar aos grupos II e III (baseados no tamanho e morfologia dos cistos) e 8 (61%) para *Naegleria*. Além dos dois citados acima, o gênero *Vannella* também foi encontrado em 2 (15%) amostras. As formas evolutivas encontradas foram documentados por fotografia digital. Não foi possível demonstrar a presença de formas flageladas de *Naegleria*. Concluimos que, conforme a literatura especializada, os gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria* são freqüentes na natureza, especialmente nos ambientes pesquisados. A caracterização das espécies e o potencial patogênico das mesmas deverá ser estudado posteriormente para as recomendações de medidas de profilaxia.

Palavras-chave: amostras ambientais, piscina, solo, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Vannella*.

TITLE: ISOLATION AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF FREE-LIVING AMOEBA FROM SOIL AND WATER (SWIMMING POOLS) SAMPLES IN BRASÍLIA, DISTRITO FEDERAL, BRAZIL.

ABSTRACT

Free-living amoebas are unicellular protozoan parasites found in humid soil and aquatic habitats. They develop in soil, dust, air and can also be isolated from motionless water, swimming pools, lakes, dams, contact lenses cleaning solutions, drains, air-conditioner, warming and ventilation units and intestinal lavage fluid. The genera of importance in Public Health are: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* and *Sappinia* (recently discovered). Considering the Public Health impact of *Acanthamoeba* and *Naegleria* genera, a research was made to verify their existence in environmental samples (open-air swimming pools and gardens) in Brasília, Brazil. Some samples from swimming pools (34) and soil (15) were collected in order to verify the presence of free-living amoebas. Direct observation of the samples previously concentrated and *in vitro* cultures were made. The *Acanthamoeba* positive samples were classified into the groups I, II and/or III of Pussard & Pons (1977). In an incident light optical microscope, we measured the cysts of the *Acanthamoeba* and *Naegleria* genera (1000x magnification); their evolutive stages were registered and phenotypically characterized. Due to the higher number of evolutive stages in comparison with all the *Acanthamoeba* and *Naegleria* positive samples, some isolates were selected (UnB 1 to UnB 13). The isolates named UnB 1 to UnB 6 were collected from swimming pools and the isolates named UnB 7 to UnB 13, from soil. We observed an effective and high proliferation in all the isolates with non-defined soy agar culture medium, incubated at 25°C. From all the samples phenotypically identified, the *Acanthamoeba* genus positive samples represented 61% (8 samples) and showed similarity to the groups II and III of Pussard & Pons (according to the cysts size and morphology); the *Naegleria* positive samples represented 61% (8 samples). Moreover, we registered the presence of *Vannella spp* in 15% of the isolates (2 samples). During the experimental tests, we used digital photography to document the evolutive stages seen. It was not possible to demonstrate the presence of the *Naegleria* flagellated forms. In accordance with the specialized literature, we conclude that *Acanthamoeba* and *Naegleria* genera can be frequently seen in nature, especially in soil and water. The characterization of the species and their pathogenic potential should be studied further to recommend prophylaxis.

Key words: environmental samples, swimming pools, soil, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Vannella*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Esquema filogenético de <i>Acanthamoeba</i> , <i>Naegleria</i> e <i>Balamuthia</i> .....	3
<b>Figura 2.</b>	Formas evolutivas do Gênero <i>Acanthamoeba</i> .....	4
<b>Figura 3.</b>	Formas evolutivas do Gênero <i>Naegleria</i> .....	6
<b>Figura 4.</b>	Formas evolutivas do Gênero <i>Balamuthia</i> .....	8
<b>Figura 5.</b>	Ciclo Biológico das Amebas de Vida Livre.....	9
<b>Figura 6.</b>	Cistos e trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> . Microscópio óptico invertido.....	25
<b>Figura 7.</b>	Cistos de <i>Acanthamoeba</i> . Microscópio óptico invertido.....	22
<b>Figura 8.</b>	Cistos de <i>Acanthamoeba</i> . Microscópio óptico de contraste de fases.....	22
<b>Figura 9.</b>	Cistos de <i>Acanthamoeba</i> . Microscópio óptico de luz incidente.....	23
<b>Figura 10.</b>	Cisto de <i>Acanthamoeba</i> . Microscópio óptico de contraste de fases.....	23
<b>Figura 11.</b>	Cisto de <i>Acanthamoeba</i> . Grupo sugerido: II. Microscópio óptico de luz incidente.....	24
<b>Figura 12.</b>	Cisto de <i>Acanthamoeba</i> . Microscópio óptico de contraste de fases.....	24
<b>Figura 13.</b>	Cisto de <i>Acanthamoeba</i> . Grupo sugerido: II/III. Microscópio óptico de luz incidente.....	25
<b>Figura 14.</b>	Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> com abertura de vacúolo e emissão de acantopódios. Microscópio óptico de luz incidente.....	25
<b>Figura 15.</b>	Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> com abertura de vacúolo e emissão de pequenos acantopódios. Microscópio óptico de contraste de interferência...	26
<b>Figura 16.</b>	Cistos de <i>Naegleria</i> . Microscópio óptico de contraste de fases.....	27
<b>Figura 17.</b>	Cisto de <i>Naegleria</i> com cromatina condensada no núcleo. Microscópio óptico de contraste de fases.....	28
<b>Figura 18.</b>	Cisto de <i>Naegleria</i> . Microscópio óptico de contraste de fases.....	28
<b>Figura 19.</b>	Cisto de <i>Naegleria</i> com poros, ectocisto, endocisto, cromatina condensada. Microscópio óptico de contraste de interferência.....	29
<b>Figura 20.</b>	Trofozoíto de <i>Naegleria</i> com pseudópodes. Microscópio óptico de contraste de fases.....	29

<b>Figura 21.</b>	Trofozoíto de <i>Naegleria</i> . Microscópio óptico de contraste de fases.....	30
<b>Figura 22.</b>	Trofozoíto de <i>Naegleria</i> com cromatina condensada no núcleo, nucléolo evidente e capa hialina. Microscópio óptico de contraste de fases.....	30
<b>Figura 23.</b>	Trofozoíto de <i>Naegleria</i> com uróide evidente. Microscópio óptico de contraste de fases.....	31
<b>Figura 24.</b>	Forma flutuante de <i>Vannella</i> . Microscópio óptico de luz incidente.....	31

### LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Aspectos comparativos de quatro gêneros de amebas de vida livre patogênicas.....	10
<b>Tabela 2.</b>	Resumo da Classificação Morfológica de Pussard & Pons.....	18
<b>Tabela 3.</b>	Clubes visitados, número de amostras, tipo de amostra, resultados e isolados selecionados das amostras de piscinas.....	21
<b>Tabela 4.</b>	Locais de coleta no solo, resultados das amostras e isolados selecionados para identificação do gênero.....	22
<b>Tabela 5.</b>	Origem dos isolados e caracterização morfológica dos gêneros em relação ao diâmetro dos cistos.....	22
<b>Tabela 2.</b>	Resumo da Classificação Morfológica de Pussard & Pons.....	24
<b>Tabela 6.</b>	Tentativa de agrupamento do Gênero <i>Acanthamoeba</i> , de acordo com Pussard & Pons.....	24

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Considerações Gerais

As Amebas de Vida Livre são protozoários unicelulares encontrados tanto no solo quanto em ambientes aquáticos e no ar atmosférico (Martinez & Visvesvara, 1997). Os gêneros dessas amebas com relevância em Saúde Pública e Patologia Humana são *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* e *Sappinia* (Martinez & Visvesvara, 1997; Marciano-Cabral et al, 2003; Schuster et al, 2004b). Desenvolvem-se no meio ambiente nos seguintes habitats: solo, poeira e ar, locais com água sem movimentação, piscinas, lagos, represas; soluções de limpeza de lentes de contato; esgotos, unidades de ar-condicionado, de aquecimento e de ventilação (Ma et al, 1990; Lorenzo-Morales et al, 2005). São resistentes a extremas condições de temperatura e de pH, ao cloro e a outros sistemas de desinfecção. Apresentam ampla dispersão mundial, com registros de isolamento em todos os continentes (Szenasi et al, 1998; Silva et al, 2003). Algumas espécies desses protozoários podem comportar-se como parasitas facultativos de seres humanos e de animais domésticos existindo sob a forma de vida livre e parasitária, sendo denominadas anfitriônicas (Page et al, 1974; Martinez & Visvesvara, 1997; Schuster et al, 2004b).

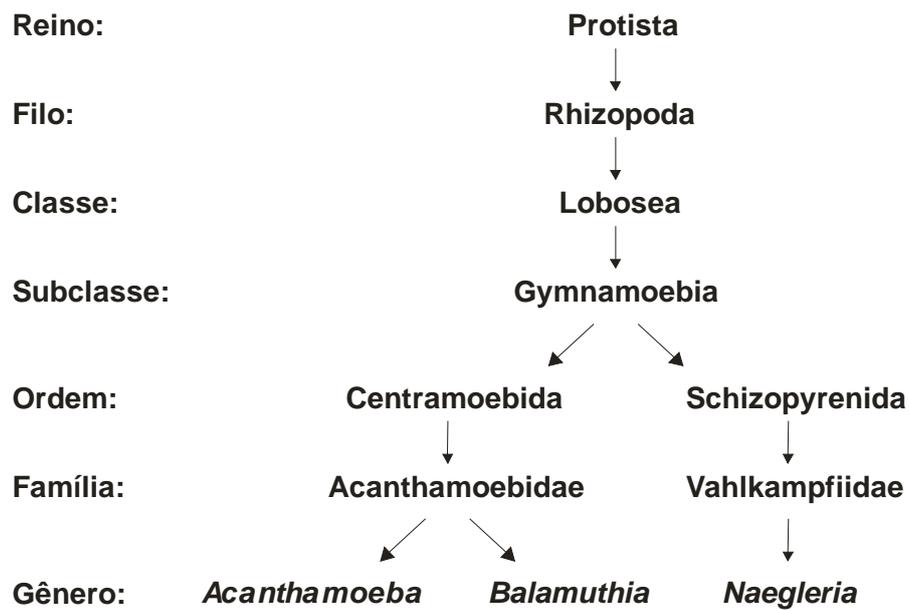
Podem ser isoladas de amostras de solo e água e estão amplamente distribuídas no ar e em ambientes fechados. No solo, as amebas alimentam-se de bactérias, com exceção do gênero *Balamuthia* que provavelmente alimenta-se de outras amebas. São capazes de infectar tanto indivíduos imunossuprimidos quanto imunocompetentes, podendo causar encefalites, ceratite, infecções cutâneas e sinusite em animais e humanos (Martinez & Visvesvara, 1997; Visvesvara GS, 1999; Schuster et al, 2004; Dubey et al, 2005).

Em 1958, Culbertson sugeriu o potencial patogênico dessas amebas (Culbertson et al, 1958). O primeiro caso de meningoencefalite amebiana relatado ocorreu em 1965 na Austrália tendo como agente etiológico amebas do gênero *Naegleria* (Fowler & Carter, 1965). Em 1972, ocorreu o primeiro caso de infecção oportunista por *Acanthamoeba* (Jager & Stamm, 1972). Casos de ceratite por *Acanthamoeba* foram diagnosticados no Reino Unido e nos Estados Unidos em 1974 e 1975, respectivamente (Naginton et al, 1974; Jones et al, 1975). Os primeiros casos de infecção por

*Balamuthia* foram identificados em 1990 (Visvesvara et al, 1990) através da morte de babuínos de um zoológico. Logo depois, em 1993, as amebas foram detectadas em humanos (Visvesvara et al, 1993). Em 2001, *Sappinia diploidea* foi relatada em um adulto imunocompetente (Revisado em Schuster et al, 2004b).

## 1.2. Classificação Taxonômica

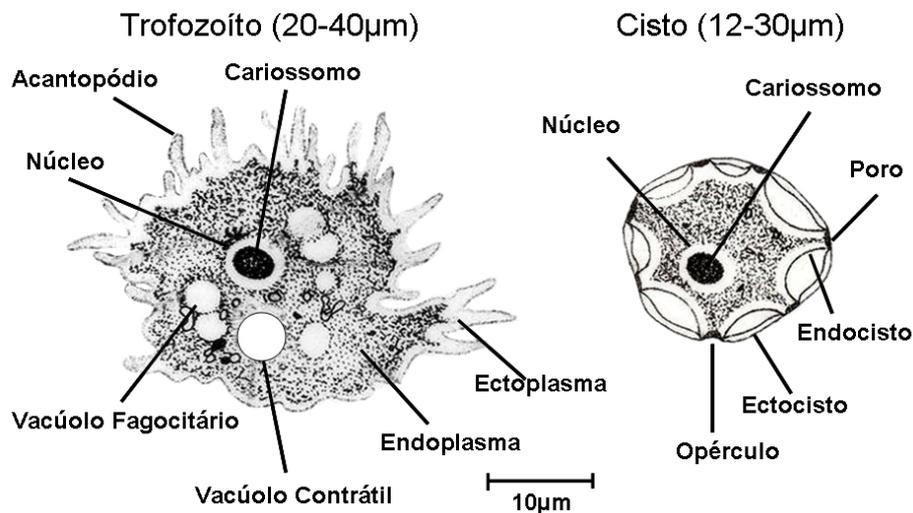
Em 2003, Marciano-Cabral & Cabral revisaram a posição do gênero *Acanthamoeba* na família Acanthamoebidae (Figura 1). O gênero *Balamuthia* também foi recentemente incluído nessa família através de estudos de análise molecular do rRNA (Ácido Ribonucléico ribossômico) do gene 16S (Revisado em Marciano-Cabral et al, 2003). Ainda existe complexidade com relação à taxonomia e à classificação dos gêneros. As primeiras identificações eram baseadas em critérios morfológicos (Sawyer et al, 1975; Volkonsky M, 1931) como divisão nuclear (Singh & Das, 1970) termotolerância (Griffin JL, 1972), análise de isoenzimas (De Jonckheere JF, 1987, Kilvington et al, 1985) e patogenicidade (De Jonckheere JF, 1981). Os trabalhos mais recentes incluem novos dados provenientes de estudos dos seqüenciamentos genômicos. Esses dados definem as amebas como um grupo polifilético. Os gêneros *Acanthamoeba* e *Balamuthia*, conforme dados de seqüenciamento do RNA ribossômico estão relativamente próximos (Zettler et al, 2000, Booton et al, 2003), mas filogeneticamente distantes de *Naegleria* e *Sappinia*. Essa distinção pode ser confirmada pela fisiopatologia das doenças relacionadas a cada grupo e o estado imunitário dos hospedeiros (Schuster et al, 2004b).



**Figura 1. Esquema filogenético de *Acanthamoeba*, *Naegleria* e *Balamuthia*.  
Modificado por Marciano-Cabral (Marciano-Cabral et al, 2003).**

### **1.3. Gênero *Acanthamoeba***

O gênero *Acanthamoeba* possui dois estágios no seu ciclo biológico: o trofozoíto (20-40µm) e o cisto (12-30µm) (Figura 2 e Tabela 1). O trofozoíto é caracterizado por possuir pseudópodes locomotivos em forma de espinhos (acantopódios) e um núcleo com nucléolo centralizado. Possui também vacúolo contrátil e fagocitário. Alimenta-se geralmente de bactéria, alga e levedura, mas pode também alimentar por inclusão de partículas líquidas. O encistamento pode ocorrer em condições ambientais adversas como hiperosmolaridade, privação de glucose, dessecação, e situações extremas de pH e temperatura. O cisto possui morfologia bem característica e de muita importância na identificação morfológica com dupla camada de celulose. Resiste a condições adversas, incluindo congelamentos repetidos com descongelamentos e também altas doses de radiação gama e Ultra - Violeta (Ma et al, 1990; Clarke et al, 2006; Duarte GA, 2006).



**Figura 2. Formas evolutivas do Gênero *Acanthamoeba* (E.G. Rondanelli, M. Scaglia. Atlas of human protozoa. Atlante dei protozoi umani. Milano: Masson, 1993: 556 pp).**

A morfologia dos cistos é de extrema importância tanto para a identificação morfológica do gênero *Acanthamoeba* quanto para a caracterização de suas espécies e a determinação de patogenicidade. Em 1975, Visvesvara e Balamuth utilizaram, dentre outros parâmetros, a morfologia dos cistos de *Acanthamoeba* em estudo comparativo de Amebas de Vida Livre patogênicas (Visvesvara & Balamuth, 1975). Pussard & Pons dividiram o gênero *Acanthamoeba* em três grupos de acordo com o tamanho e a morfologia dos cistos (Pussard & Pons, 1977). Mazur e colaboradores demonstraram “in vitro” que os cistos podem permanecer viáveis por até 20 anos (Mazur et al, 1995).

A primeira suspeita de que *Acanthamoeba* poderia causar doenças em humanos ocorreu em 1958 durante ensaios usando vacinas anti-pólio. Placas apareceram em culturas de células usadas no preparo das vacinas e pensava-se que tivessem sido induzidas por vírus porque os camundongos e os macacos morriam de encefalite após a inoculação da suspensão da cultura de tecidos. Entretanto, descobriu-se mais tarde que aquelas placas eram causadas por amebas. Tanto trofozoítos quanto cistos foram detectados nas culturas de células e foram identificados como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*. Essas observações sobre a morte de modelos experimentais por encefalite levaram Culbertson e colaboradores a sugerir o potencial patogênico das Amebas de Vida Livre como causadoras de doenças em seres humanos (Culbertson et al, 1958).

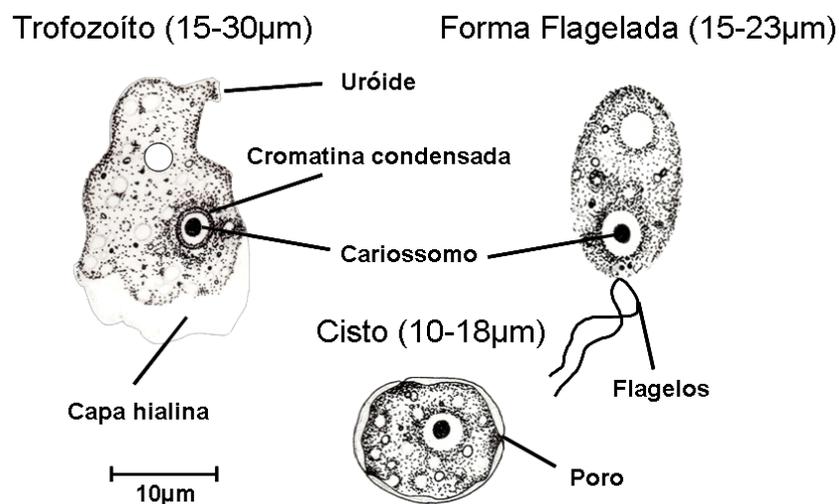
Casos de encefalite em humanos foram relatados logo depois na Austrália, Europa, África, América do Sul e Estados Unidos. Entretanto, alguns desses casos foram identificados posteriormente como meningoencefalite amebiana primária (MAP), uma doença do Sistema Nervoso Central (SNC) rapidamente fatal causada por um outro tipo de Ameba de Vida Livre, *Naegleria fowleri*. Os primeiros casos que estabeleceram claramente *Acanthamoeba* como agente causador de doenças em humanos foram relatados no início da década de 1970 e foram descritos casos de encefalite, ceratite e infecções de pele por ameba. Conseqüentemente, por diferentes tipos de Ameba de Vida Livre poderem infectar o Sistema Nervoso Central, o termo EAG (Encefalite Amebiana Granulomatosa) é utilizado para infecções causadas por *Acanthamoeba spp* enquanto que o termo MAP é reservado para infecções do SNC causadas por *Naegleria fowleri* (Revisado em Marciano-Cabral et al, 2003).

Algumas espécies do gênero *Acanthamoeba* são agentes etiológicos de ceratite em indivíduos imunocompetentes e encefalite amebiana granulomatosa (EAG) em indivíduos imunossuprimidos, bem como de infecções cutâneas e nasofaríngeas (Figura 5) (Ma et al, 1990; Ferrante A, 1991). O gênero é encontrado mundialmente no solo, poeira, lagos e rios, piscinas, aparelhos de ar-condicionado, água do mar, soluções de lentes de contato e nasofaringe de indivíduos imunocompetentes (Clarke et al, 2006; Duarte et al, 2006). “In vitro” crescem melhor em baixas temperaturas (Ferrante A, 1991). Pacientes imunossuprimidos que moram próximo a locais com água sem movimentação podem estar expostos a alguns fatores de risco para infecção por *Acanthamoeba* (Duarte et al, 2006). No caso da ceratite causada por *Acanthamoeba*, os principais fatores de risco são: uso de lentes de contato e trauma prévio da córnea (Clarke et al, 2006).

Recentemente, técnicas com base em PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) e análise do gene 18S rRNA (Ácido Ribonucléico ribossômico) combinadas com critérios morfológicos foram usadas para identificar 20 espécies do gênero *Acanthamoeba*, confirmando a pluridade e o grande número de espécies deste gênero (Stothard et al, 1998).

#### 1.4. Gênero *Naegleria*

O ciclo evolutivo das amebas do gênero *Naegleria* é composto por três fases: trofozoíto, cisto e forma flagelada temporária, na maioria das espécies (Figura 3 e Tabela 1). O trofozoíto mede de 15 a 30 $\mu$ m e possui um núcleo com um grande cariossomo rodeado por um halo. A locomoção se dá por pseudópodes do tipo lobópodes formando protrusões sucessivas em diferentes pontos da superfície da célula o que faz com que sua forma mude constantemente. O vacúolo contrátil é bem visível no citoplasma e válido para o reconhecimento da presença de trofozoítos. O uróide, estrutura circular, é localizado na parte posterior da ameba. O trofozoíto alimenta-se de partículas ou de bactérias e reproduz-se por mitose. O cisto é caracterizado pela presença de parede redonda, dupla e que possui de dois a três poros. Possui baixa resistência à dessecação. Quando o ambiente é favorável, ocorre o excistamento. Na maioria das espécies, a fase flagelada pode ser induzida “in vitro” e o trofozoíto se transforma em forma flagelada com geralmente 2 flagelos terminais. Essa transformação dura cerca de 30 a 60 minutos (Ma et al, 1990).



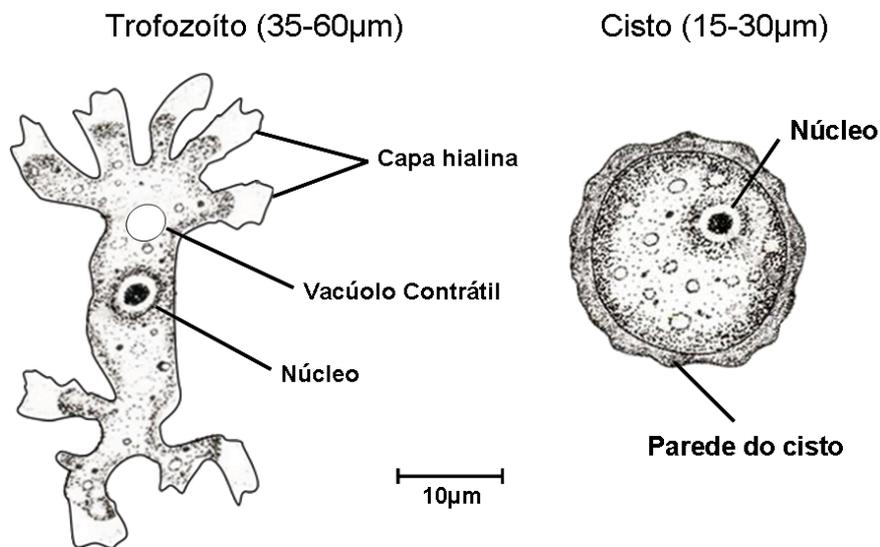
**Figura 3. Formas evolutivas do Gênero *Naegleria* (E.G. Rondanelli, M. Scaglia. Atlas of human protozoa. Atlante dei protozoi umani. Milano: Masson, 1993: 556 pp).**

*Naegleria fowleri* é o agente causador da meningoencefalite amebiana primária (MAP), infecção não-opportunista tanto em crianças saudáveis quanto em adultos jovens com história prévia de contato com água sem movimentação. A MAP é caracterizada como uma doença fulminante de evolução rápida e fatal com duração média de uma a duas semanas após a hospitalização. Devido ao curso rápido da infecção e à dificuldade de diagnóstico poucos pacientes sobrevivem (Figura 5) (Ma et al, 1990; Ferrante A, 1991, ).

A MAP foi relatada pela primeira vez em 1970 por Carter, após Fowler ter reconhecido pela primeira vez a doença na Austrália. Desde então inúmeros são os relatos de MAP em todo o mundo. Até o momento, existem mais de 30 espécies patogênicas e não patogênicas de *Naegleria* descritas (De Jonckheere JF, 2002).

### **1.5. Gênero *Balamuthia***

*Balamuthia mandrillaris*, parente próximo da *Acanthamoeba*, causa infecções similares tanto em indivíduos imunossuprimidos quanto em imunocompetentes, estes representados na maioria das vezes por crianças (Figura 5). Foi isolada pela primeira vez do cérebro de um babuíno, morto por encefalite em um zoológico. O ciclo evolutivo compreende duas fases: trofozoíto e cisto (Figura 4 e Tabela 1). O trofozoíto é uni nucleado, de forma variada e mede de 12 a 60µm de diâmetro. O cisto possui tripla parede, o ectocisto, o mesocisto e o endocisto. “In vitro”, as amebas do gênero *Balamuthia* não se alimentam de bactérias, mas sim de pequenas amebas presentes no solo ou em culturas de células. Desenvolvem-se apenas “in vitro” em culturas de células, nas quais produzem efeitos citopáticos e destruição celular através de vacuolização e picnose nuclear (Visvesvara et al, 1993).



**Figura 4. Formas evolutivas do Gênero *Balamuthia* (E.G. Rondanelli, M. Scaglia. Atlas of human protozoa. Atlante dei protozoi umani. Milano: Masson, 1993: 556 pp).**

### 1.6. Gênero *Sappinia*

Um único caso de encefalite por *Sappinia diploidea* foi relatado em um adulto imunocompetente. Foi isolada de amostras ambientais e fezes humanas. O trofozoíto é relativamente grande com pseudópodes indefinidos e parede enrugada durante o movimento. Sua característica principal é a presença de dois núcleos. O cisto também possui dois núcleos (Tabela 1). Assim como outras amebas isoladas de fezes, são caracterizadas como coprozóicas. O cisto pode resistir ao suco gástrico e passagem pelo intestino. A sua presença nas fezes não significa infecção, desde que permaneçam como cisto durante essa passagem. Os sintomas descritos no caso da encefalite acima relatada foram: cefaléia, convulsões, turvação visual, fotofobia e vômito. O paciente relatou também contato prévio com animais do campo e provavelmente foi exposto a cistos de *Sappinia diploidea* provenientes do ar. Foi diagnosticado sinusite antes da encefalite, suportando a hipótese da nasofaringe como porta de entrada. Após cirurgia e tratamento, o paciente recuperou-se e não houve seqüelas (Revisado em Schuster et al, 2004b).

## 1.7. Ciclo Biológico

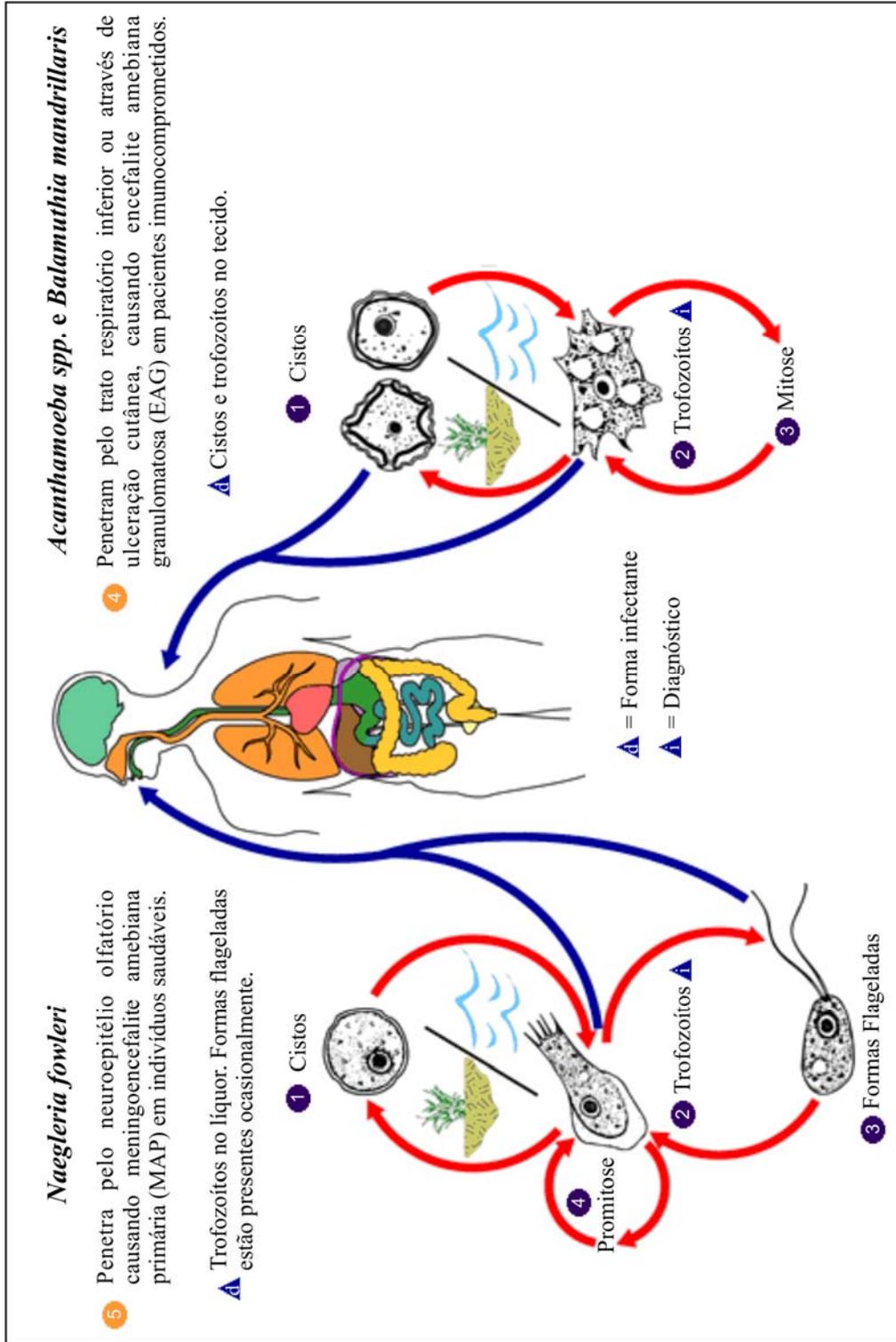


Figura 5. Ciclo biológico das amebas de vida livre (CDC).

## 1.8. Comparações entre os quatro gêneros de Amebas de Vida Livre patogênicas

Tabela 1. Aspectos comparativos de quatro gêneros de Amebas de Vida Livre patogênicas, adaptada de Schuster et al, 2004b.

	<i>Acanthamoeba</i> <i>spp.</i> (infecções sistêmicas)	<i>Acanthamoeba</i> <i>spp.</i> (ceratite)	<i>Naegleria</i> <i>fowleri</i>	<i>Balamuthia</i> <i>mandrillaris</i>	<i>Sappinia</i> <i>diploidea</i>
Trofozoítos	15-30µm com acantópodos; velocidade: 0,3-0,4µm/s	Núcleo vesicular	15-30µm com pseudópode ectoplasmático anterior eruptivo. velocidade: ~1,0µm/s	12-60µm; polimórficos. velocidade: ~0,25µm/s	45-85µm; com película espessa, frequentemente com rugas; binucleados; movimentação lenta.
Forma flagelada	Não encontrada		Transforma-se em formas flageladas típicas com dois flagelos	Não encontrada	Não encontrada
Cistos	Dupla parede com poros; 10-15µm de diâmetro; os cistos são formados no tecido cerebral e na córnea.		Dupla parede com poros; 7-15µm de diâmetro; os cistos não são formados no tecido cerebral.	Tripla parede sem poros; 10-30µm de diâmetro; os cistos são formados no tecido cerebral.	Parede espessa, 13-37µm de diâmetro; binucleados, poros (?); não foram visualizados cistos em tecidos.
Habitat	Solo, água, ambientes domésticos e ambientes hospitalares		Solo, água aquecida, correntes de águas termais poluídas.	Solo e provavelmente em água fresca.	Solo, água fresca, fezes de herbívoros.
Doenças	Encefalite granulomatosa amebiana; infecção cutânea e sinusite.	Ceratite amebiana	Meningoencefalite Amebiana Primária	Encefalite amebiana granulomatosa; infecção cutânea e sinusite.	Encefalite amebiana; granuloma não visualizado; provável sinusite
Fatores de risco	Comprometimento imunológico	Uso de lentes de contato gelatinosas; uso de lentes durante a natação.	Atividades em água aquecida, mergulho (a água penetra pelas narinas).	Comprometimento imunológico. Rash cutâneo contaminado por solo.	Dados insuficientes.

## **1.9. Caracterização morfológica**

Embora o potencial patogênico das Amebas de Vida Livre seja determinado por parâmetros morfológicos, bioquímicos e, atualmente, moleculares, é através do exame das características morfológicas que basicamente o trabalho de identificação e reconhecimento de patogenicidade é iniciado. Em 1976, Page classificou diversas espécies de Amebas de Vida Livre de água e solo através de chaves relacionadas a aspectos morfológicos (Page FC, 1976). Em 1977, Pussard & Pons (Pussard & Pons, 1977) agruparam espécies do gênero *Acanthamoeba* em três grupos morfológicos com base no tamanho e na morfologia dos cistos. Ainda hoje, estes estudos são as principais referências para a identificação morfológica dos gêneros (Marciano-Cabral et al, 2003; Walochnik et al, 2000b). A classificação morfológica preliminar serve, portanto, como base para confirmação de resultados por estudos posteriores.

## **1.10. Isolamento Ambiental**

### **1.10.1. No Mundo**

Há relatos de isolamento de Amebas de Vida Livre tanto na atmosfera, quanto em amostras de solo e piscinas no mundo todo. Em 1969, Kingston e Warhust isolaram Amebas de Vida Livre no ar (Kingston & Warhust, 1969). Em 1982, essas amebas foram isoladas em amostras de solo e água em uma região gelada do deserto na Antártica (Brown et al, 1982). Na Itália, em 1987, foram isoladas de águas termais e bacias de lama (Scaglia et al, 1987). Em 1989, Amebas de Vida Livre patogênicas foram identificadas em águas termais da cidade de Hidalgo no México (Rivera et al, 1989). Em 1991, também foram detectadas espécies de *Acanthamoeba* e *Naegleria* em locais úmidos nas unidades de fisioterapia de alguns hospitais em Koblenz, Alemanha (Michel et al, 1991). Na atmosfera da cidade de San Luis Potosi no México, foram isoladas, em 1993, Amebas de Vida Livre (Rodriguez-Zaragoza et al, 1993) e em 1997, espécies de *Acanthamoeba* (Rodriguez-Zaragoza et al 1997). Em 1998, verificou-se a presença de Amebas de Vida Livre em sistemas de água quente em hospitais de Koblenz, Alemanha (Rohr et al, 1998). No ano de 2001, Amebas de Vida Livre foram

identificadas em ambientes aquáticos e “swabs” coletados do solo nos distritos de Thailand e Hamamatsu, Japão (Nacapunchai et al, 2001). No Chile, Muñoz e colaboradores isolaram Amebas de Vida Livre em piscinas públicas de Santiago, em 2003 (Muñoz et al, 2003). Ainda em 2003, Amebas de Vida Livre do gênero *Naegleria* foram isoladas de águas termais em Nova Orleans, nos Estados Unidos da América (Sheehan et al, 2003). Em 2004 Amebas de Vida Livre potencialmente patogênicas foram isoladas de piscinas na cidade de Szczecin, na Polônia (Górnik et al, 2004). Em 2005, amebas do gênero *Acanthamoeba* foram isoladas de amostras de água nas Ilhas Canárias na Espanha (Lorenzo-Morales et al, 2005a). No mesmo ano, essas amebas foram isoladas de amostras de areia do mar também nas Ilhas Canárias na Espanha (Lorenzo-Morales et al, 2005b).

### **1.10.2. No Brasil**

No Brasil, de 1981 a 1985 foi isolada e estudada uma cepa virulenta do gênero *Acanthamoeba* em coleções de água em diferentes pontos da cidade do Rio de Janeiro (Lima et al, 1985). Em 1982, Salazar e colaboradores isolaram diversos gêneros de Amebas de Vida Livre em água mineral engarrafada na cidade do Rio de Janeiro (Salazar et al, 1982). Em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, no ano de 1984, Amebas de Vida Livre foram encontradas em água de piscina (Chaves CM, 1984). No Rio de Janeiro, em 1985, foram isoladas Amebas de Vida Livre em locais com poluição térmica (Moura et al, 1985). Na cidade de São Paulo isolaram-se essas amebas em piscinas aquecidas e não aquecidas, em 1985 (Foronda et al, 1985). Em 1995, Giazzi isolou Amebas de Vida Livre em areia, na cidade de Araraquara (Giazzi JF, 1995). Em 2003, foram também isoladas em poeira de hospitais no município de Presidente Prudente, São Paulo (Silva et al, 2003).

Os relatos de isolamento destes protozoários no Brasil em comparação aos relatos do mundo é realmente escasso e limitado. Na região Centro-Oeste, bem como no Distrito Federal, não é do nosso conhecimento nenhum relato de isolamento desses protozoários em qualquer tipo de habitat. Reconhecendo então a importância em Saúde Pública das patologias relacionadas às Amebas de Vida Livre e a necessidade da descrição da presença e caracterização destes protozoários, realizamos este estudo, caracterizado como o primeiro no Distrito Federal.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1) Geral

- Identificar e caracterizar a presença de Amebas de Vida Livre em amostras ambientais de Brasília, Distrito Federal, através de parâmetros morfológicos.

### 2.2) Específicos:

- Valorizar os procedimentos usados para cultivar os protozoários, através do emprego de técnicas tradicionais de coleta e de isolamento primário de Amebas de Vida Livre de amostras ambientais, com meio de cultura “in vitro”.
- Identificar e caracterizar fenotipicamente as amebas isoladas através de parâmetros morfométricos com microscopia óptica.
- Classificar o gênero *Acanthamoeba* de acordo com a Classificação proposta por Pussard & Pons, baseada na morfologia e biometria dos cistos (Pussard & Pons, 1977).
- Classificar o gênero *Naegleria* pelo teste de flagelação dos trofozoitos “in vitro”.
- Documentar as formas evolutivas encontradas através de fotografia digital.
- Montar uma coleção biológica de isolamento primário de Amebas de Vida Livre para estudos posteriores de identificação molecular e análise de parâmetros de patogenicidade.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1) Fontes de Isolamento das amebas:

As amostras ambientais foram escolhidas por conveniência e coletadas de água da superfície de piscinas e “swabs” de filtros de retorno. No solo, as amostras foram coletadas através de raspado.

#### 3.2) Meio de cultura:

O meio de cultura utilizado para o isolamento e cultivo das Amebas de Vida Livre foi o ágar – soja, descrito em 1979 por Annette Silva Foronda. A autora comparou vários meios de cultura utilizados na época e comprovou a eficácia do meio de cultura ágar – soja no cultivo de Amebas de Vida Livre (Foronda AS, 1979).

A composição do meio foi a seguinte:

- 0,2g de farinha de soja “Superbom”;
- 100ml de água destilada;
- 1,5g de ágar bacteriológico “DIFCO”.

A farinha de soja em foi dissolvida em água destilada e deixada em repouso “overnight”. No dia seguinte, a solução foi filtrada com papel de filtro com porosidade 1,5 e o ágar foi acrescentado à solução. A solução foi autoclavada a 120°C durante 20 minutos. O meio foi distribuído dentro da câmara de fluxo laminar em placas de Petri que posteriormente foram vedadas com Parafilm e armazenadas a 4°C.

### **3.3) Isolamento primário de Amebas de Vida Livre de piscinas:**

#### **3.3.1) Coleta direta de água da superfície de piscinas e “swab” das bordas do filtro de retorno:**

Através de um levantamento dos clubes do DF foram agendadas, por telefone, visitas a 11 clubes, onde foi esclarecido o Projeto e solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO I). A assinatura do termo incluía a participação dos estabelecimentos, com a segurança do total sigilo dos dados pertencentes a cada local.

Foram coletadas 34 amostras dos 11 clubes visitados, no período de Setembro a Novembro de 2005. As amostras foram retiradas de piscinas para adultos e crianças.

As amostras de água de piscina foram coletadas em frascos estéreis de vidro de 200ml na superfície da piscina perto de um dos filtros de retorno. Em alguns clubes, onde a saída dos filtros de retorno era próxima da superfície, foram coletados “swabs” das bordas de um desses filtros. Os “swabs” foram transportados dentro dos frascos contendo água das respectivas piscinas. Os frascos e os “swabs” foram lacrados e transportados em temperatura ambiente até o Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina da UnB.

#### **3.3.2) Semeadura:**

As amostras de água foram centrifugadas a 1500rpm (rotações por minuto) durante 5 minutos. O sedimento foi coletado com uma pipeta Pasteur (cerca de 2ml) e semeado no centro das placas de Petri contendo ágar-soja. Na semeadura de todas as amostras, não foi utilizada a camada de bactérias mortas pelo calor (*Escherichia coli*) para alimentação das amebas, uma vez que as amostras ambientais são sempre carregadas de substrato e as amebas desenvolvem-se bem em ágar-soja (de acordo com comunicação pessoal em atividade de treinamento com a prof. Dra. Annette Silva Foronda, em Janeiro de 2005, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo).

O restante da amostra foi colocado em cálices de sedimentação e, após cerca de 24 horas, uma gota do sedimento foi semeada em placas de Petri. Os “swabs” foram semeados diretamente nas placas com meio de cultura. As semeaduras foram realizadas em capela de fluxo laminar vertical e com o uso dos seguintes Equipamentos de Proteção Individual (EPIs): jaleco com punho, luvas, máscara e óculos.

#### **3.3.4) Temperatura de incubação:**

As placas foram incubadas a 25°C (temperatura ambiente) em estufa no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB).

### **3.4) Isolamento primário de Amebas de Vida Livre no solo:**

#### **3.4.1) Coleta:**

Foram coletadas 15 amostras de solo de um dos jardins da Universidade de Brasília (UnB), através de raspado do solo com lâmina estéril.

#### **3.4.2) Semeadura:**

Os raspados de solo foram semeados imediatamente no centro de placas com ágar-soja.

#### **3.4.3) Temperatura de incubação:**

As placas foram incubadas a 25°C (temperatura ambiente) em estufa no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB).

### **3.5) Desenvolvimento em meio de cultura:**

As placas semeadas de todo o material coletado foram observadas ao microscópio óptico invertido durante um mês com intervalos de 48 horas para detectar o aparecimento de trofozoítos e cistos de Amebas de Vida Livre na superfície do ágar. Todos os procedimentos foram realizados com o uso de EPIs.

### **3.6) Seleção dos isolados:**

As placas de isolamento primário consideradas positivas, com morfologia e com maior quantidade de trofozoítos e cistos foram selecionadas com o objetivo de realizar a identificação genérica, biometria dos cistos e documentação fotográfica. Essas placas selecionadas foram denominadas de isolados (UnB1 a UnB13).

### **3.7) Biometria:**

As placas selecionadas (isolados) foram lavadas na câmara de fluxo laminar com cerca de 2ml de água destilada estéril para a observação entre lâmina e lamínula ao microscópio óptico de luz incidente. As placas positivas para os gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria* foram submetidas a biometria (medida dos cistos) realizada através do exame do lavado das placas (com cerca de 10ml de água destilada estéril e pipeta Pasteur) (Page, 1986). Nesta ocasião, foram medidos cerca de 100 cistos de cada placa escolhida para a identificação morfológica dos gêneros de acordo com as características biométricas propostas por Page. Após o exame, o restante do lavado das placas foi mantido em eppendorffs a 25°C, na estufa.

### 3.8) Classificação morfológica de acordo com Pussard & Pons (Pussard & Pons, 1977):

As amostras positivas para o gênero *Acanthamoeba* foram também submetidas a contagem do número de braços do endocisto e classificadas nos Grupos I, II e III de acordo com Pussard & Pons (Pussard & Pons, 1977) (Tabela 2).

**Tabela 2. Resumo da classificação morfológica baseada no diâmetro do cisto e número de braços do endocisto conforme referido por Pussard & Pons (Pussard & Pons, 1977).**

GRUPOS				
I	II		III	
Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Braços <sup>#</sup>	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Poros <sup>+</sup>
>18	10 – 16	0; 4 – 7,5	11 – 18	4,5 – 9

#parede interna do endocisto.  
+poros do endocisto.

### 3.9) Teste de flagelação:

O teste de flagelação foi realizado para confirmação da presença do gênero *Naegleria* em todos os isolados (Page FC, 1976). Uma gota do lavado da placa foi colocada sobre a lamínula contendo vaselina nas bordas e coberta posteriormente com a lâmina escavada e incubada a 37°C durante 4 horas. A observação foi realizada em intervalos de 2 horas para detectar o aparecimento de formas flageladas do gênero *Naegleria*.

### 3.10) Documentação Fotográfica:

Os cistos e trofozoítos desses dois gêneros foram documentados através de fotografia digital ao microscópio óptico invertido. No momento da realização da biometria, houve a documentação ao microscópio óptico de luz incidente e de contraste de fases. Houve também documentação ao microscópio óptico de luz incidente (Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da UnB) e de contraste de interferência (Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UnB) através de captura de imagem.

### **3.11) Manutenção das culturas:**

Todas as placas de isolamento primário foram mantidas a 25°C no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina, UnB. Nas amostras positivas, foram feitos repiques através da retirada de um pedaço de ágar da placa de isolamento primário onde havia maior quantidade de cistos e semeadura em uma nova placa com a parte superior para baixo. Esse procedimento foi utilizado para a manutenção das culturas e da coleção biológica e era realizado quando já havia grande quantidade de cistos, ou seja, em intervalos de um mês.

## 4. RESULTADOS

### 4.1) Isolamento primário de Amebas de Vida Livre de piscinas e seleção dos isolados:

Os resultados das amostras de piscina foram os seguintes: das 33 amostras coletadas, 13 (39,33%) foram positivas para Amebas de Vida Livre com a presença de formas evolutivas (Tabela 3). Das 13 amostras positivas para Amebas de Vida Livre, foram selecionadas 6 amostras e denominadas isolados, para identificação do gênero de acordo com a maior presença de formas evolutivas visualizadas. Dos 11 clubes visitados e coletados, 9 foram representados na escolha dos isolados, pois continham maior número dessas formas. Dentre as 6 amostras selecionadas (isolados), foram identificados morfologicamente os seguintes gêneros: *Naegleria* 5 (83,3%); *Acanthamoeba* 1 (16,6%) e *Vannella* 1 (16,6%) (Tabela 5).

### 4.2) Isolamento primário de Amebas de Vida Livre do solo e seleção dos isolados:

Dentre as 15 amostras de solo coletadas, 14 (93,3%) foram positivas para Amebas de Vida Livre com a presença de pelo menos uma forma evolutiva das amebas (Tabela 4). Das 14 amostras positivas, de acordo com a maior presença de formas evolutivas, foram selecionadas 7 amostras para identificação do gênero (Tabela 4). Dentre as sete amostras selecionadas (isolados), foram identificados morfologicamente os seguintes gêneros *Acanthamoeba* 7 (100%); *Naegleria* 3 (42,85%) e *Vannella* 1 (14,28%) (Tabela 5).

**Tabela 3. Clubes visitados, número de amostras, tipo de amostra, resultados e isolados selecionados das amostras de piscinas.**

<b>CLUBES</b>	<b>NÚMERO DE AMOSTRAS</b>	<b>PISCINAS</b>	<b>TIPO DE AMOSTRA</b>	<b>RESULTADO</b>	<b>ISOLADOS</b>
C1	2	Adulto	Água		
		Infantil	Água		
C2	2	Adulto	Água	+	UnB6
		Infantil	Água		
C3	2	Adulto	Água		
		Infantil	Água		
C4	2	Adulto	Água	+	UnB2
		Infantil	Água	+	UnB1
C5	1	Adulto	Água		
C6	4	Adulto	Água		
		Infantil	Água		
		Adulto	“swab”		
		Infantil	“swab”	+	
C7	4	Adulto	Água	+	
		Infantil	Água		
		Adulto	“swab”		
		Infantil	“swab”		
C8	4	Adulto	Água	+	UnB5
		Infantil	Água		
		Adulto	“swab”		
		Infantil	“swab”		
C9	4	Adulto	Água	+	UnB3
		Infantil	Água		
		Adulto	“swab”	+	UnB4
		Infantil	“swab”		
C10	4	Adulto	Água	+	
		Infantil	Água	+	
		Adulto	“swab”	+	
		Infantil	“swab”	+	
C11	4	Adulto	Água		
		Infantil	Água		
		Adulto	“swab”	+	
		Infantil	“swab”		
<b>TOTAL:</b>	<b>33 amostras</b>		<b>21 água</b>	<b>13 amostras</b>	<b>6 isolados</b>
			<b>12 “swab”</b>	<b>positivas</b>	

C1 a C11: clubes visitados.

**Tabela 4. Locais de coleta no solo, resultados das amostras e isolados selecionados para identificação do gênero.**

LOCAIS DO JARDIM	NÚMERO DE AMOSTRAS	RESULTADOS	ISOLADOS
J1	J1 a	+	UnB12
	J1 b	+	
	J1 c	+	UnB8
	J1 d	+	UnB10
J2	J2 a	+	
	J2 b	+	UnB13
	J2 c	+	UnB9
	J2 d	+	
	J2 e	+	
	J2 f	+	UnB7
J3	J3 a	+	
	J3 b	+	UnB11
	J3 c		
	J3 d	+	
J4	J4 a	+	
<b>TOTAL: 4 locais</b>	<b>15 amostras</b>	<b>14 amostras positivas</b>	<b>7 isolados</b>

J: abreviatura de jardim.

**Tabela 5. Origem dos isolados e identificação dos gêneros em relação ao diâmetro dos cistos.**

AMOSTRAS	ORIGEM	GÊNEROS	DIÂMETROS DOS CISTOS (µm)*
UnB 1	Água	<i>Naegleria</i>	9 - 14
UnB 2	Água	<i>Acanthamoeba</i>	8 - 13
UnB 3	Água	<i>Naegleria</i>	4 - 9
UnB 4	Água	<i>Naegleria</i>	5 - 9
UnB 5	Água	<i>Naegleria</i> <i>Vanella</i>	3 - 10 nm**
UnB 6	Água	<i>Naegleria</i>	6 - 10
UnB 7	Solo	<i>Acanthamoeba</i>	7 - 15
UnB 8	Solo	<i>Acanthamoeba</i>	12 - 14
UnB 9	Solo	<i>Acanthamoeba</i>	9 - 15
UnB 10	Solo	<i>Acanthamoeba</i> <i>Naegleria</i>	10 - 17 5 - 15
UnB 11	Solo	<i>Acanthamoeba</i> <i>Naegleria</i>	8 - 15 7 - 10
UnB 12	Solo	<i>Acanthamoeba</i> <i>Naegleria</i>	9 - 14 6 - 9
UnB 13	Solo	<i>Acanthamoeba</i> <i>Vanella</i>	9 - 14 nm**

\*: medidas do menor e maior diâmetro em aproximadamente 100 cistos.

\*\*nm: não medido

#### **4.3) Origem dos isolados:**

Os isolados UnB 1 a UnB 6 foram originados de piscinas e os isolados UnB 7 a UnB 13, de amostras de solo.

#### **4.4) Desenvolvimento em meio de cultura:**

Todos os isolados exibiram uma alta e eficiente proliferação em meio de cultura não definido, ágar-soja, a 25°C.

No isolados UnB 5 (proveniente de água de piscina) e UnB 10 a UnB13 (de solo), foram identificados dois gêneros de amebas. No isolado UnB 5 foram observadas *Naegleria* e *Vannella*, nos isolados UnB 10 a UnB 12, *Acanthamoeba* e *Naegleria* e no isolado UnB 13, *Acanthamoeba* e *Vannella*. Em todos os outros isolados foi identificado um único gênero de Amebas de Vida Livre.

#### **4.5) Biometria:**

Dentre os isolados, foram identificadas fenotipicamente 8 (61%) amostras positivas para *Acanthamoeba*, 8 (61%) para *Naegleria* e 2 (15%) amostras para *Vannella*. O diâmetro médio dos cistos foi calculado através da medida de, aproximadamente, 100 cistos de cada isolado ao exame direto dos lavados das placas. O exame foi realizado entre lâmina e lamínula, ao microscópio óptico luz incidente com ocular micrométrica, no aumento de 1000X (Tabela 5).

#### **4.6) Classificação morfológica de acordo com Pussard & Pons (Pussard & Pons, 1977):**

As amostras positivas para *Acanthamoeba* demonstraram morfologia similar aos grupos II e III de Pussard & Pons (1977) (baseados no tamanho médio dos cistos e no número de braços do endocisto) (Tabela 2 e Tabela 6). As medidas dos diâmetros dos cistos e a contagem do número braços do endocisto dos isolados foram submetidas ao cálculo da média ponderada, conforme proposto por Pussard & Pons (Pussard & Pons, 1977).

**Tabela 2. Resumo da classificação morfológica baseada no diâmetro do cisto e número de braços do endocisto conforme referido por Pussard & Pons (Pussard & Pons, 1977).**

GRUPOS				
I	II		III	
Diâmetro (µm) >18	Diâmetro (µm) 10 – 16	Braços <sup>#</sup> 0; 4 – 7,5	Diâmetro (µm) 11 – 18	Poros <sup>+</sup> 4,5 – 9

#parede interna do endocisto.  
+poros do endocisto.

**Tabela 6. Tentativa de agrupamento de *Acanthamoeba spp*, de acordo com Pussard & Pons (1977), baseada no diâmetro médio dos cistos e número de braços do endocisto.**

AMOSTRAS	DIÂMETRO MÉDIO* DOS CISTOS (µm)	MEDIA* DE BRAÇOS" DO ENDOCISTO	GRUPOS SUGERIDOS
UnB 2	10,68 (n= 100)	2,98	II
UnB 7	11 (n= 100)	2,31	II;III
UnB 8	13 (n= 4)	3,5	II
UnB 9	11,87 (n= 100)	3,43	II
UnB 10	13,26 (n= 100)	4,34	II
UnB 11	10,47 (n= 100)	3,53	II
UnB 12	11,44 (n= 18)	0	II;III
UnB 13	12,22 (n= 100)	3,31	II

\*: média ponderada

" : prolongamento da parede interna dos cistos de *Acanthamoeba spp*.

#### 4.7) Teste de flagelação:

Tentativas de indução “in vitro” de flagelação do gênero *Naegleria* foram realizadas nos isolados positivos para esse gênero (UnB1, UnB3, UnB4, UnB5, UnB6, UnB10, UnB11, UnB12). Contudo, não conseguimos visualizar a forma flagelada após a indução.

#### 4.8) Documentação Fotográfica:

As formas evolutivas foram documentadas por fotografia digital e captura de imagem, através de microscopia óptica invertida, de contraste de fases, de contraste de interferência e de luz incidente. Foi possível documentar e visualizar estruturas como núcleo, ectocisto (parede externa do cisto) e endocisto (parede interna do cisto), capa hialina (região de emissão dos pseudópodes) e vacúolos.

#### 4.8.1) Formas evolutivas do gênero *Acanthamoeba*:

Cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* foram documentados tanto na superfície do ágar ao microscópio óptico invertido (Figuras 6 e 7) quanto no exame direto do lavado das placas aos microscópios ópticos de contraste de fases (Figuras 8, 10 e 12), de luz incidente (Figuras 9, 11,13 e 14) e de contraste de interferência (Figura 15).

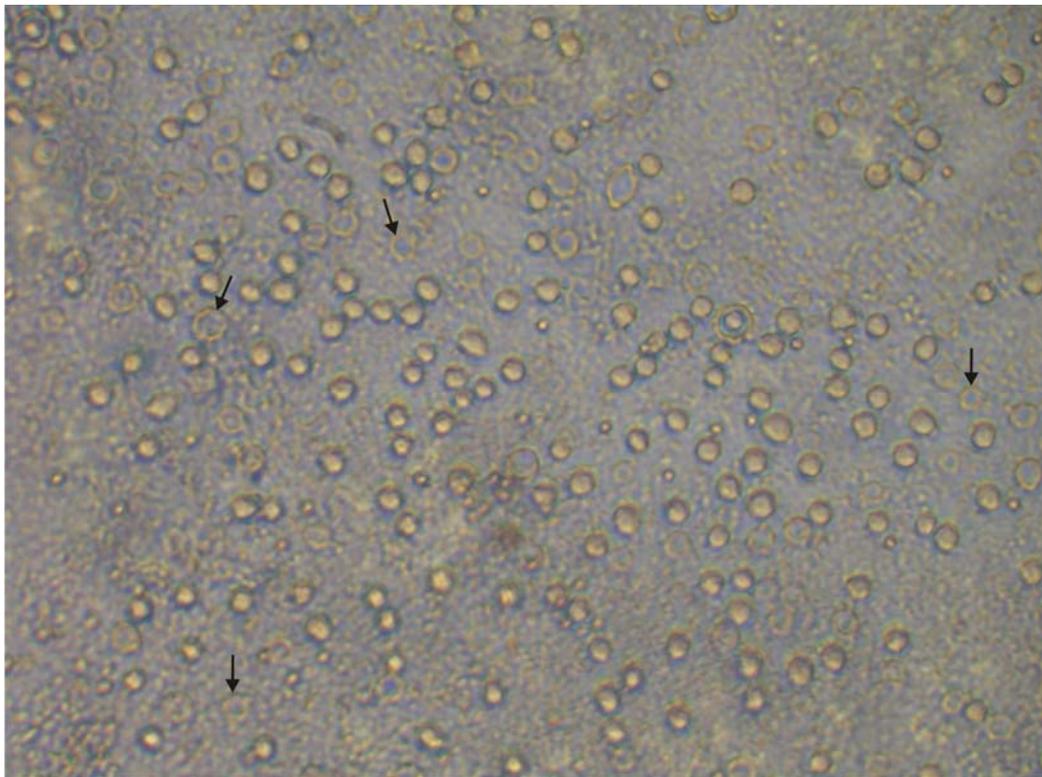
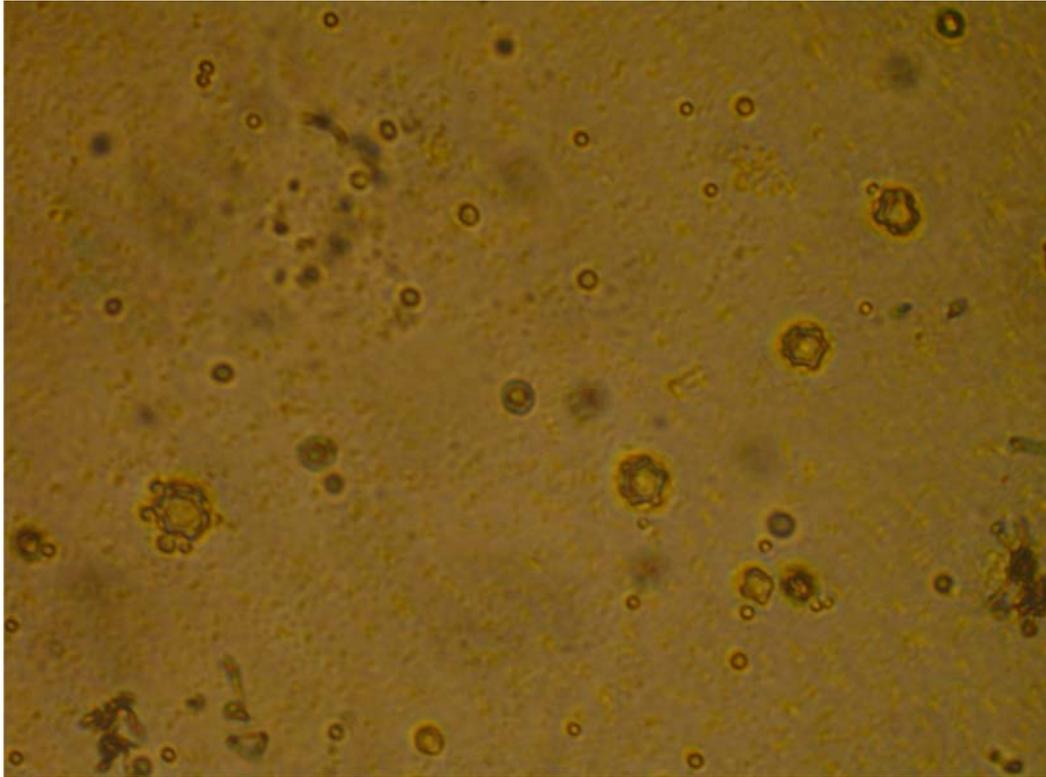
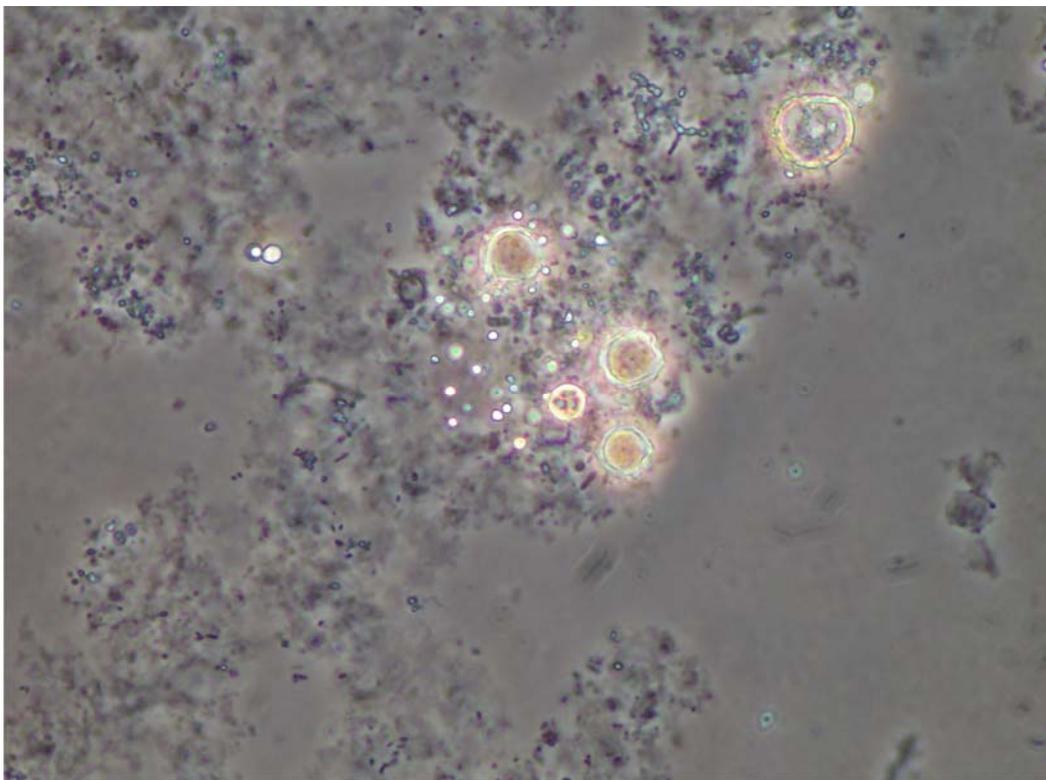


Figura 6. Cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* na superfície do ágar-soja em placa de Petri. Microscópio óptico invertido. Aumento de 400X. As setas indicam os trofozoítos.



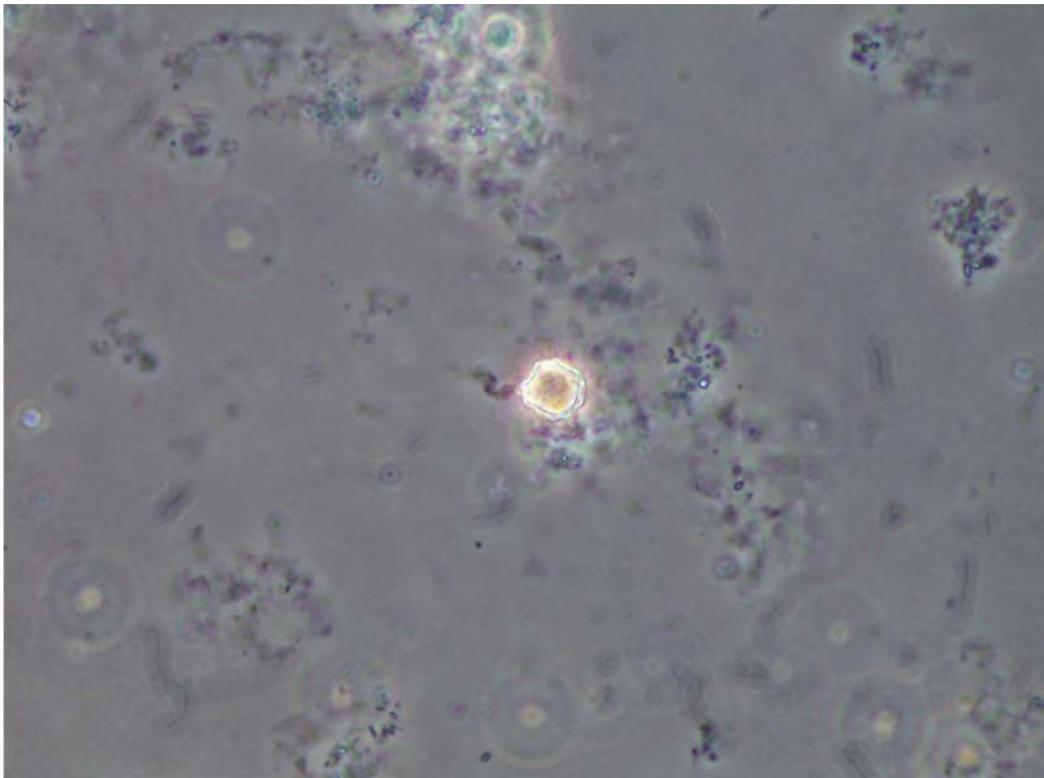
**Figura 7.** Cistos de *Acanthamoeba* na superfície do ágar-soja em placa de Petri. Microscópio óptico invertido. Aumento de 600X.



**Figura 8.** Cistos de *Acanthamoeba*. Exame direto do lavado da placa de cultura entre lâmina e lamínula. Microscópio óptico de contraste de fases. Aumento de 400X.



**Figura 9. Cistos de *Acanthamoeba*. Exame direto do lavado da placa de cultura entre lâmina e lamínula. Microscópio óptico de luz incidente. Aumento de 1000X.**



**Figura 10. Cisto de *Acanthamoeba*. Exame direto do lavado da placa de cultura entre lâmina e lamínula. Microscópio óptico de contraste de fases. Aumento de 400X.**

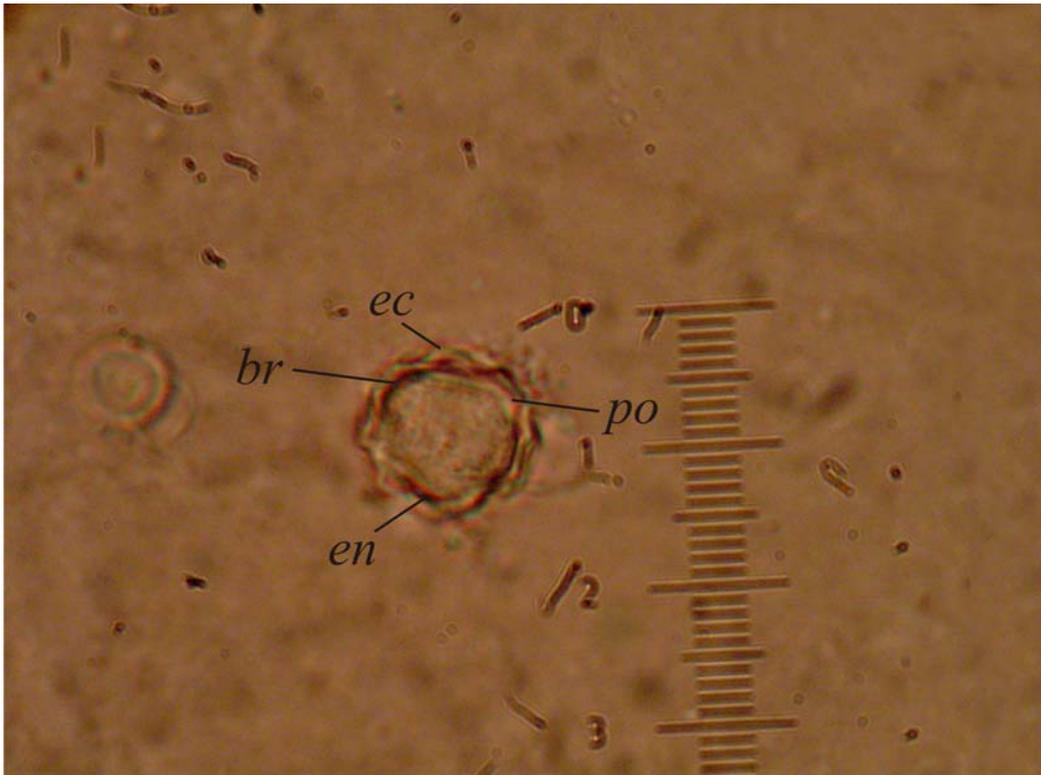


Figura 11. Cisto de *Acanthamoeba* (Grupo sugerido: II) - endocisto (*en*) estrelado e presença de braços (*br*). Ectocisto (*ec*) e poros (*po*). Exame direto do lavado da placa de cultura entre lâmina e lamínula. Microscópio óptico de luz incidente. Aumento de 1000X.

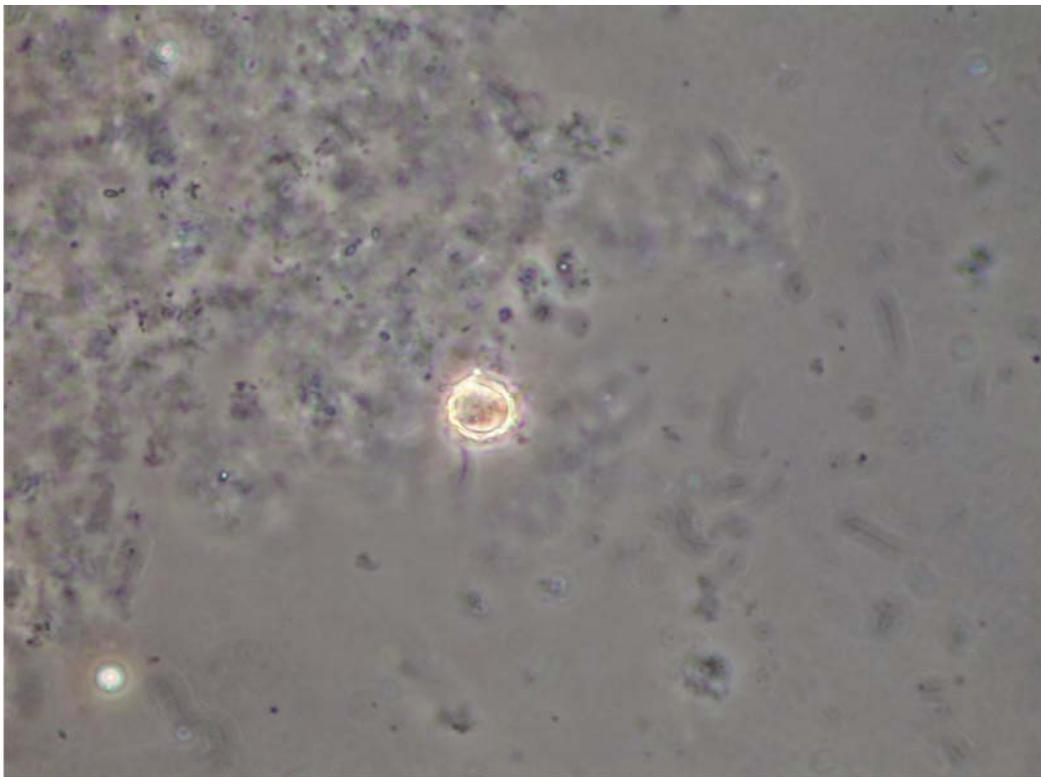


Figura 12. Cisto de *Acanthamoeba*. Exame direto do lavado da placa de cultura entre lâmina e lamínula. Microscópio óptico de contraste de fases. Aumento de 400X.

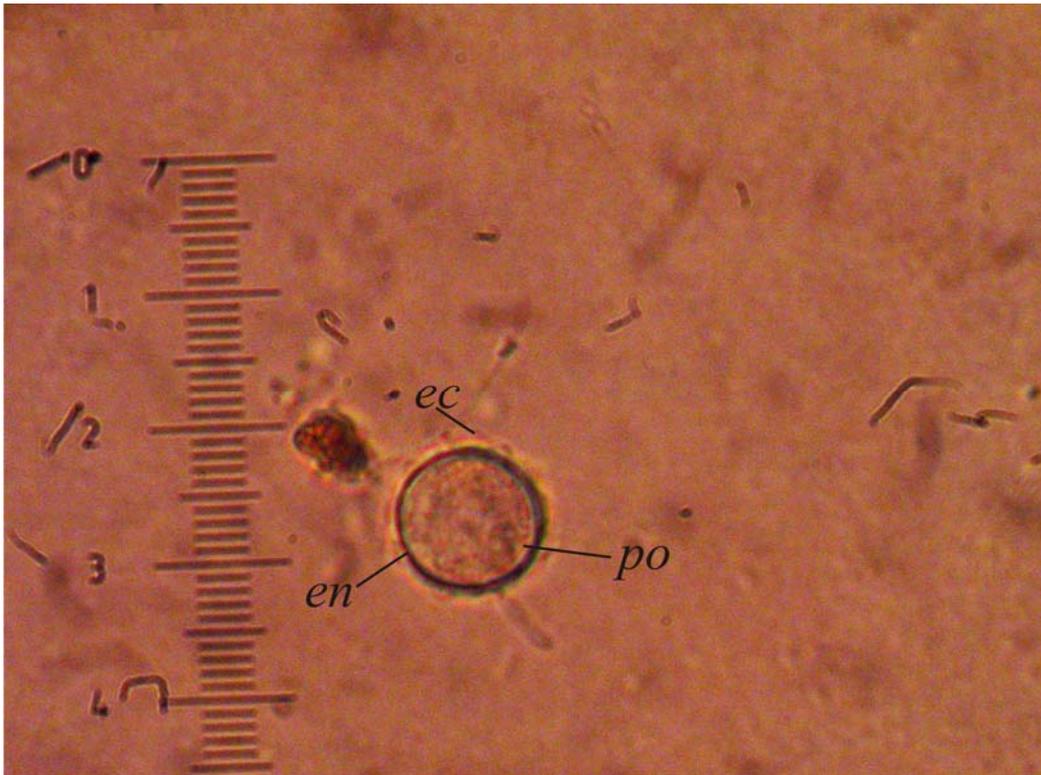


Figura 13. Cisto de *Acanthamoeba* (Grupo sugerido: II/III - endocisto globoso e ausência de braços); ectocisto (*ec*), endocisto (*en*) e poros (*po*). Exame direto do lavado da placa de cultura entre lâmina e lamínula. Microscópio óptico de luz incidente. Aumento de 1000X.

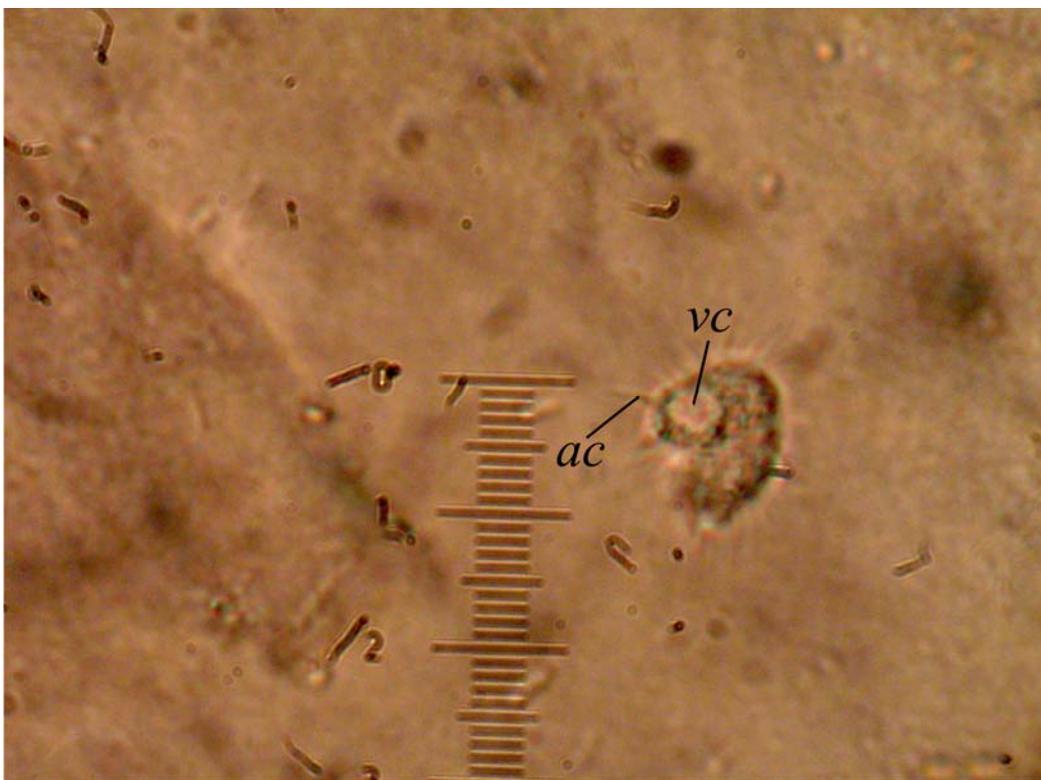
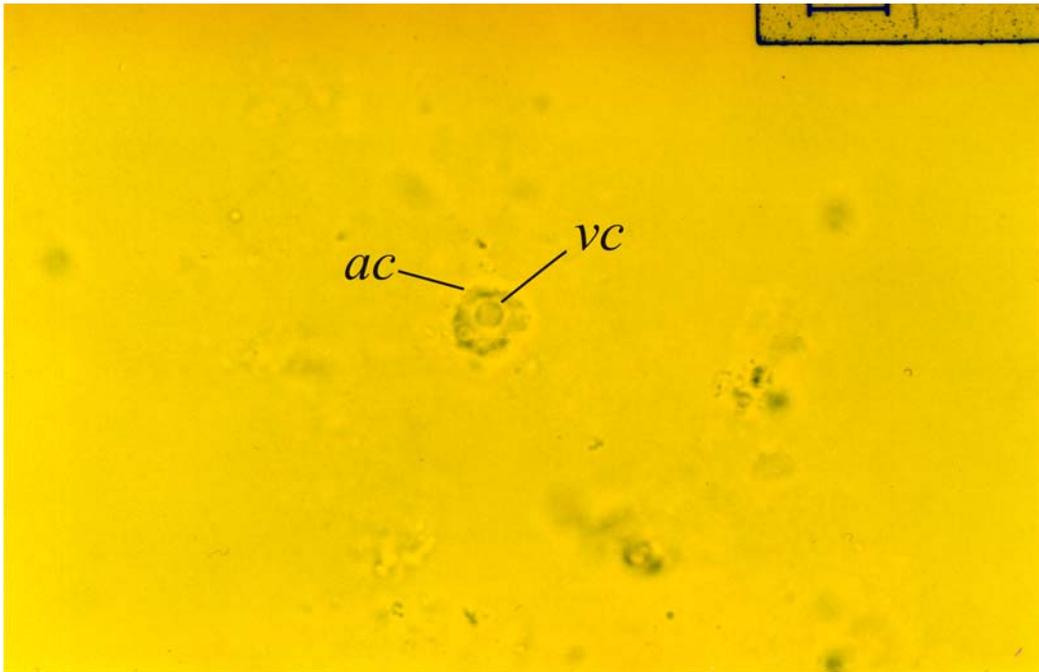


Figura 14. Trofozoíto de *Acanthamoeba* com abertura de vacúolo (*vc*) e emissão de acantopódios (*ac*). Exame direto do lavado da placa de cultura entre lâmina e lamínula. Microscópio óptico de luz incidente. Aumento de 1000X.



**Figura 15.** Trofozoíto de *Acanthamoeba* com abertura de vacúolo (*vc*) e emissão de pequenos acantopódios (*ac*). Exame direto do lavado da placa entre lâmina e lamínula. Microscópio óptico de contraste de interferência. Aumento de 1000X. A barra mede 10µm.

#### 4.8.2) Formas evolutivas dos gêneros *Naegleria* e *Vannella*:

As formas evolutivas do gênero *Naegleria* foram documentadas ao microscópio óptico de contraste de fases (Figuras 16 a 18 e 20 a 23) e contraste de interferência (Figura 19). A forma flutuante de *Vannella* foi documentada ao microscópio óptico de luz incidente (Figura 24).



**Figura 16. Cistos de *Naegleria*. Exame direto do lavado da placa entre lâmina e lamínula. Microscópio óptico de contraste de fases. Aumento de 400X.**

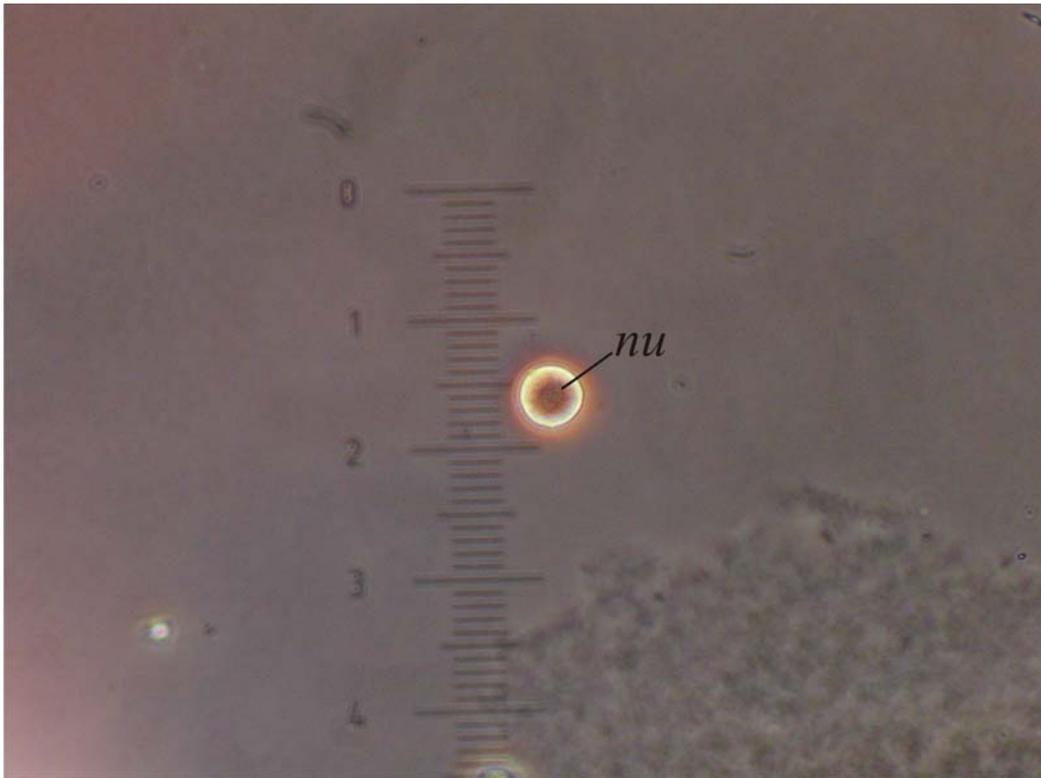


Figura 17. Cisto de *Naegleria* com cromatina condensada no núcleo (*nu*). Exame direto do lavado da placa entre lâmina e lamínula. Microscópio óptico de contraste de fases. Aumento de 400X.

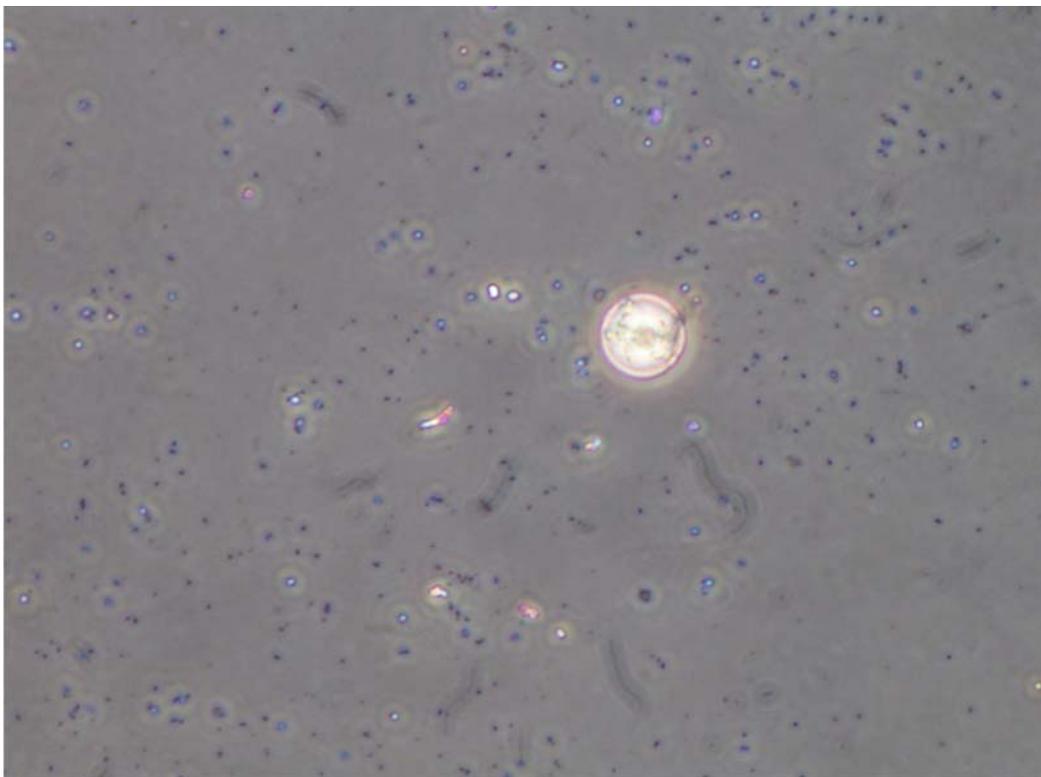


Figura 18. Cisto de *Naegleria*. Exame direto do lavado da placa entre lâmina e lamínula. Microscópio óptico de contraste de fases. Aumento de 400X.

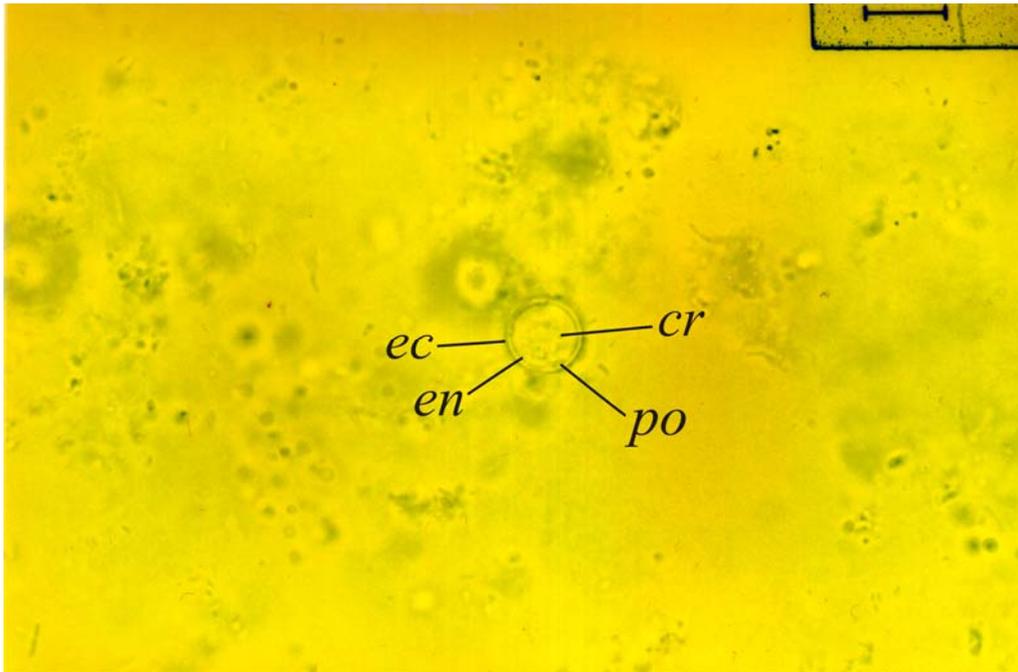


Figura 19. Cisto de *Naegleria* com poros (*po*), ectocisto (*ec*), endocisto (*en*), cromatina condensada (*cr*). Exame direto do lavado da placa entre lâmina e lamínula. Microscópio óptico de contraste de interferência. Aumento de 1000x. A barra mede 10 $\mu$ m.

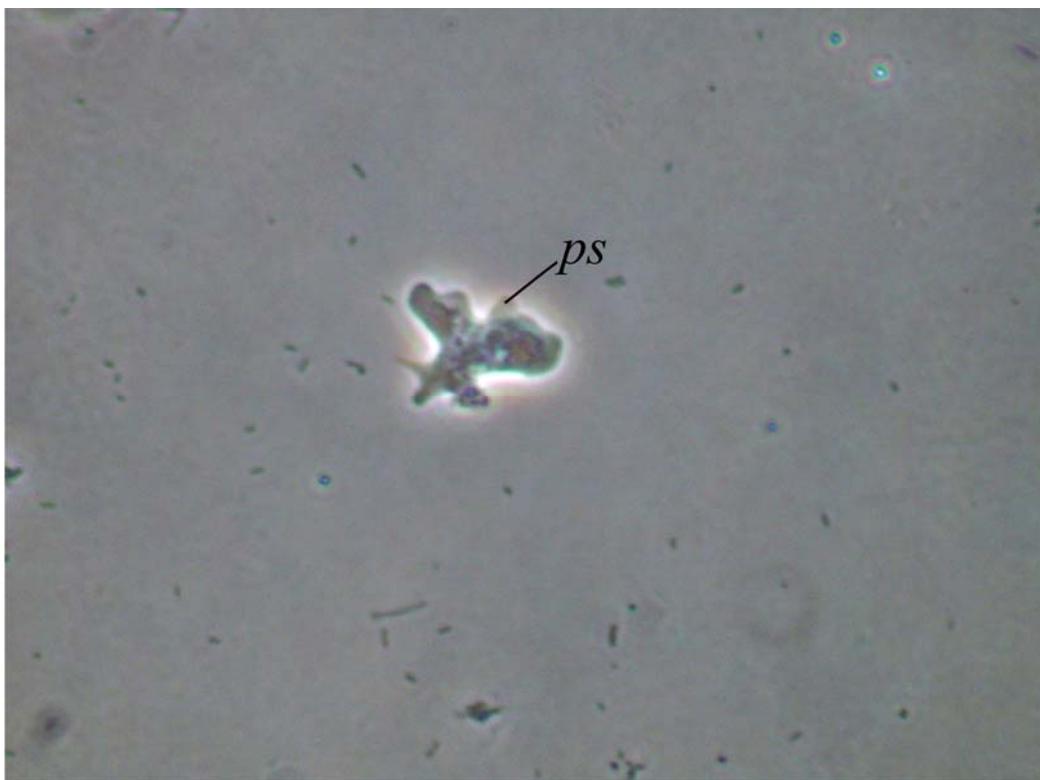


Figura 20. Trofozoíto de *Naegleria* com pseudópodes (*ps*). Exame direto do lavado da placa entre lâmina e lamínula. Microscópio óptico de contraste de fases. Aumento de 400X.



Figura 21. Trofozoíto de *Naegleria*. Exame direto do lavado da placa entre lâmina e lamínula. Microscópio óptico de contraste de fases. Aumento de 400X.

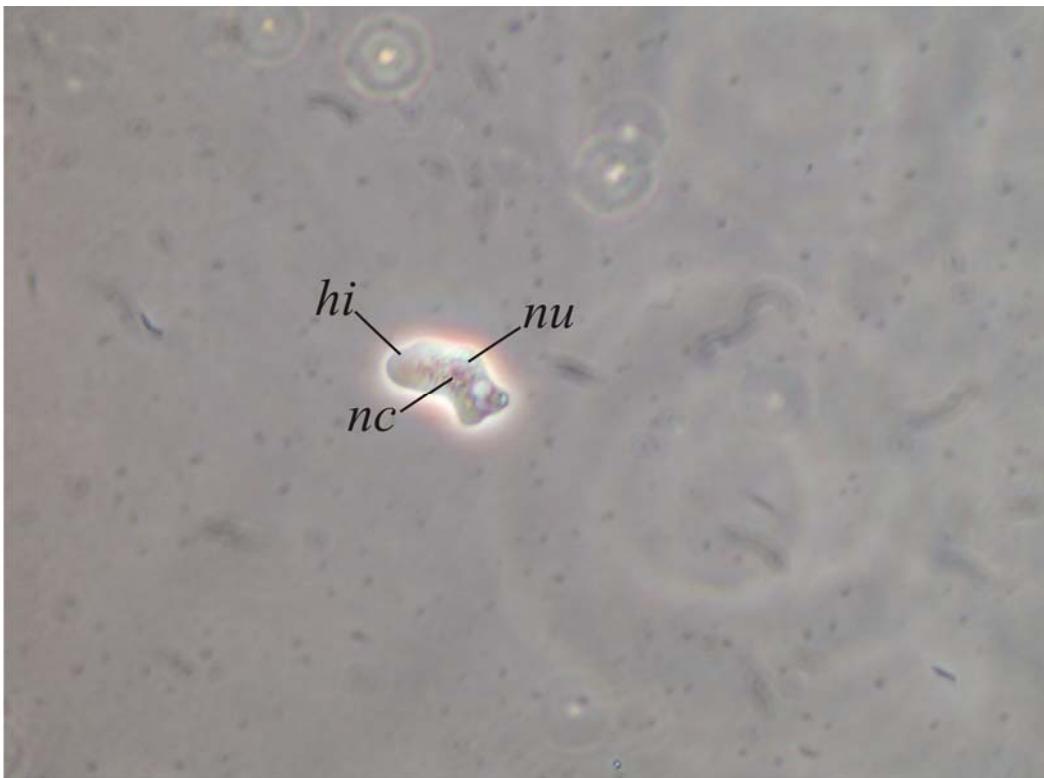
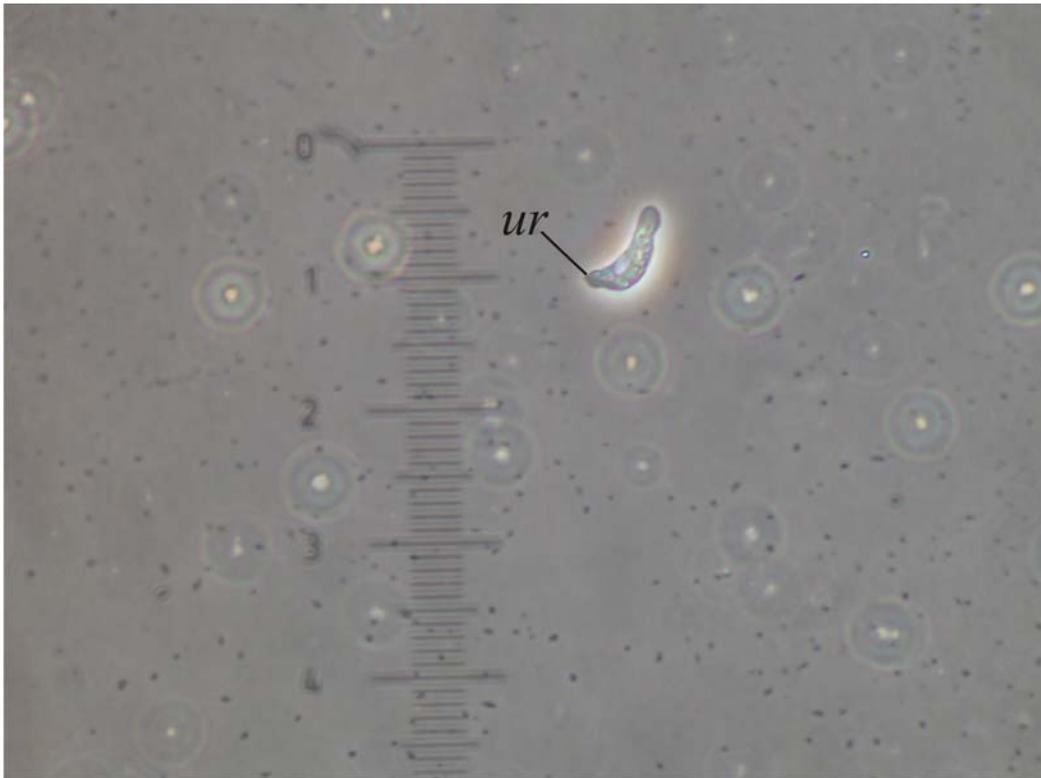
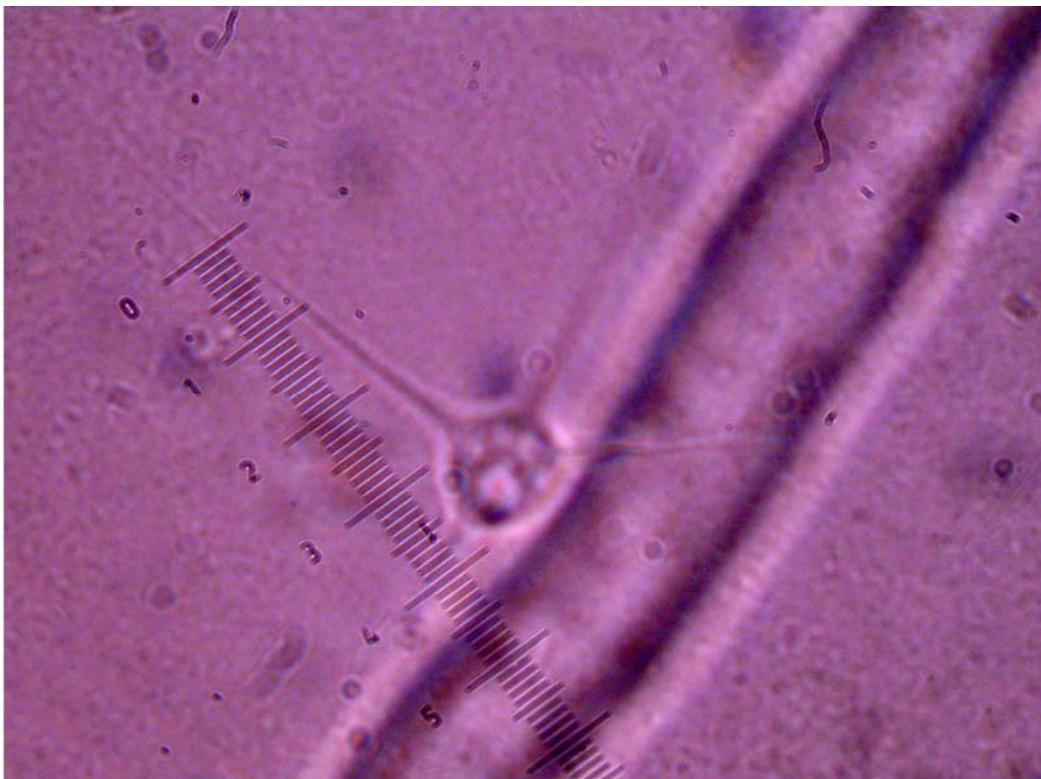


Figura 22. Trofozoíto de *Naegleria* com cromatina condensada no núcleo (*nu*), nucléolo evidente (*nc*) e capa hialina (*hi*). Exame direto do lavado da placa entre lâmina e lamínula. Microscópio óptico de contraste de fases. Aumento de 400X.



**Figura 23.** Trofozoíto de *Naegleria* com uróide evidente (*ur*). Exame direto do lavado da placa entre lâmina e lamínula. Microscópio óptico de contraste de fases. Aumento de 400X.



**Figura 24.** Forma flutuante de *Vannella*. Exame direto do lavado da placa entre lâmina e lamínula. Microscópio óptico de luz incidente. Aumento de 1000x.

## 5. DISCUSSÃO

A pesquisa de Amebas de Vida Livre em amostras ambientais como solo e água tem sido realizada em diferentes lugares em todo o mundo desde a descoberta do potencial patogênico dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria* em 1958 (Kingston & Warhust, 1969; Brown et al, 1982; Scaglia et al, 1987; Rivera et al, 1989; Michel et al, 1991; Rodriguez-Zaragoza et al, 1993; Rodriguez-Zaragoza et al, 1997; Rohr et al, 1998; Nacapunchai et al, 2001; Lorenzo-Morales et al, 2005a; Górnik et al, 2004; Lorenzo-Morales et al, 2005b).

Todas as piscinas onde foram coletadas as amostras situavam-se em ambientes abertos, isto é, ao ar-livre. Não se estabeleceu nenhuma relação entre a presença de Amebas de Vida Livre e o tipo de ambiente, neste caso, aberto. No entanto, Górnik e colaboradores (Górnik et al, 2004) analisaram amostras de piscinas em ambientes fechados e ao ar-livre a fim de estabelecer a frequência de Amebas de Vida Livre potencialmente patogênicas. No estudo acima relatado foram identificadas 5 cepas não-patogênicas de *Acanthamoeba* em piscinas de ambientes fechados. Nas piscinas ao ar livre foram encontradas 5 cepas com características de patogenicidade. Os testes de patogenicidade foram realizados através da inoculação em camundongos. Embora tenham sido observadas cepas patogênicas somente em piscinas ao ar-livre, Amebas de Vida Livre foram encontradas nos dois ambientes. Como no nosso estudo não foi realizado nenhum teste de patogenicidade, não podemos afirmar sobre essa característica nos gêneros encontrados, embora os gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria* contenham espécies potencialmente patogênicas. Entretanto, o autor acima referido afirma que a precipitação atmosférica e a poluição orgânica transportada pelos banhistas para as piscinas ao ar-livre podem favorecer o potencial de virulência das cepas encontradas nesses ambientes. São conhecidos relatos de isolamento de Amebas de Vida Livre no ar atmosférico (Kingston & Warhust, 1969; Rodriguez-Zaragoza et al, 1993).

No nosso trabalho, foram encontradas Amebas de Vida Livre em 13 (38%) das 34 amostras de piscinas coletadas. Nas 6 placas de amostras de água selecionadas (isolados) houve a presença dos gêneros *Naegleria* em 5 (83%) amostras e *Acanthamoeba* em 1 (16%) amostra e *Vannella* em 1 (16%) amostra.

No clube C1, o único que utilizava sal grosso no tratamento das piscinas, o resultado da pesquisa de Amebas de Vida Livre foi negativo. Apesar de não termos

realizado medidas para a verificação da concentração de cloro nas piscinas, em todos os outros clubes onde foram coletadas as amostras o tratamento era realizado com cloro granulado ou cloro gasoso, de acordo com o tratamento padrão para água de piscina. Conforme a determinação da Resolução de Diretoria Colegiada 77 (RDC nº 77, 2001), o cloro deve ter sua concentração na água das piscinas de acordo com as especificações contidas no rótulo de cada fabricante do produto. No México, Rivera e colaboradores, em 1993, demonstraram (Rivera et al, 1993) que a concentração de cloro comumente usada em piscinas não era suficiente para eliminar cistos viáveis de Amebas de Vida Livre. Alguns autores afirmam ainda que o cloro pode favorecer o desenvolvimento das amebas, uma vez que diminui a quantidade de fungos e algas que concorrem com as mesmas. Outros autores relatam que os cistos de Amebas de Vida Livre chegam até as piscinas por diversos meios: através do abastecimento, pelo ar ou até mesmo pelos próprios banhistas, uma vez que as mesmas estão presentes no solo (Revisado em Muñoz et al, 2003). No Brasil, trabalhos anteriores demonstraram a presença de Amebas de Vida Livre apesar do tratamento com cloro (Chaves CM, 1984; Foronda et al, 1985; Giazzi JF, 1995).

Nas amostras de solo do nosso estudo, a frequência de Amebas de Vida Livre foi relativamente elevada. Das 15 amostras coletadas, 14 (93%) foram positivas. Dentre as amostras selecionadas (isolados), o gênero *Acanthamoeba* apareceu em todas (100%) as amostras. A frequência do gênero *Naegleria*, porém, foi menor: 3 (42%) amostras, além do gênero *Vannella* em 1 (14%) amostra. Tsvetkova (Tsvetkova et al, 2004) encontraram uma alta frequência de Amebas de Vida Livre em amostras de barro. No nosso trabalho, devido ao local de coleta das amostras de solo (jardins), no momento das coletas, o solo encontrava-se bem úmido nesses locais. Giazzi, em 1996, demonstrou a prevalência de Amebas de Vida Livre em 23 amostras de solo e outros locais e obteve um percentual de 86,9% para espécies de *Acanthamoeba* e 39,1% para espécies de *Naegleria* (Giazzi JF, 1996). Em 2000, Silva e colaboradores também encontraram maior frequência do gênero *Acanthamoeba* (45,5%) do que *Naegleria* (3,8%) em amostras de poeira de hospitais (Silva et al, 2003). A frequência por nós encontrada, corroborou os achados anteriores. Os cistos de *Acanthamoeba* são bastante resistentes a inúmeras condições adversas inclusive à dessecação. Os cistos de *Naegleria* são menos resistentes a essa situação (Singh & Das, 1972).

Dentre os isolados selecionados para caracterização morfológica dos gêneros, observou-se uma maior frequência do gênero *Naegleria* (83%) nos isolados de água e,

dentre os isolados de solo, o gênero *Acanthamoeba* (100%) foi mais predominante. O gênero *Vannella* também foi identificado nos isolados dos dois tipos de amostras (16% e 14%: solo e água, respectivamente). Muñoz e colaboradores encontraram uma maior prevalência do gênero *Naegleria* do que *Acanthamoeba* em amostras de piscinas públicas em Santiago, Chile (Muñoz et al, 2003). Embora o gênero *Acanthamoeba* seja reconhecidamente o mais predominante em amostras ambientais, no nosso trabalho, representantes do gênero *Naegleria* foram mais freqüentes nas amostras de água das amostras selecionadas (isolados).

No isolado UnB4, proveniente de “swab” das bordas das saídas dos filtros de retorno das piscinas, o gênero *Naegleria* foi identificado. Esses filtros de retorno são constituídos de areia e há relatos de isolamento de Amebas de Vida Livre inclusive em areia (Brown et al, 1982; Muñoz et al, 2003; Silva et al, 2003) o que pode ter contribuído para a presença de amebas vida livre nas amostras do nosso estudo. Ao passar o “swab” nas bordas da saída dos filtros era percebido uma camada aderida. Esta camada pode ter servido de alimento para as Amebas de Vida Livre por ser um potencial reduto de fungos, bactérias e matéria orgânica. Salazar e colaboradores encontraram alta prevalência de amebas do gênero *Acanthamoeba* em amostras de água mineral engarrafada na cidade do Rio de Janeiro. Demonstraram ainda a presença de flagelados e bactérias em concomitância com as amebas, provavelmente servindo de alimento para as mesmas (Salazar et al, 1982), evidenciando a falta de controle sanitário respectivo.

O isolado UnB6 foi proveniente de piscina com água aquecida e foram observadas formas evolutivas do gênero *Naegleria* que tem como uma de suas características a termotolerância. Este parâmetro é uma das características de algumas espécies patogênicas e não patogênicas de *Naegleria* (De Jonckheere JF, 2002).

Hoffmann e colaboradores demonstraram a diminuição de Amebas de Vida Livre em sistemas de distribuição de água na Alemanha através da filtração por carvão ativado. A diminuição, segundo o autor, não significa ausência ou a retenção total das amebas pelo filtro. Embora a filtração demonstre eficácia na retenção das amebas, outros fatores podem estar relacionados à presença dessas amebas na água purificada. Observaram também a dependência sazonal de *Naegleria* em amostras de água, pois só conseguiram isolar este gênero no período de Julho a Setembro. *Acanthamoeba* porém foi isolada durante o ano todo. Entretanto, uma concentração maior de amebas e uma grande variedade foram observadas no intervalo de Agosto a Outubro (Hoffmann et al,

2001). No nosso, caso não poderíamos concluir a influência sazonal na presença das amebas, uma vez que as amostras foram coletadas em um único período, de Setembro a Novembro do ano de 2005, início das chuvas em Brasília, Distrito Federal.

Como era esperado, houve grande contaminação das amostras por bactérias e fungos de esporos resistentes, especialmente naquelas que foram coletadas do solo. Entretanto, a visualização das formas evolutivas não foi prejudicada, ressaltando a grande resistência dessas amebas, conforme documentado neste trabalho.

Parâmetros fisiológicos como: termotolerância, crescimento em meio de cultura definido, migração na superfície do ágar e efeito citopático em culturas de células humanas são relatados na avaliação da patogenicidade. No entanto, ainda não existe um método único definido e universalmente aceito para essa avaliação (Walochnik et al, 2000a).

O isolamento primário de Amebas de Vida Livre é descrito na literatura através da semeadura de amostras (de diversas origens) em placas de ágar contendo meio de cultura. A manutenção da cultura é feita através dos repiques que consistem na retirada de um pedaço de ágar contendo cistos e/ou trofozoítos e posterior implantação no centro de uma nova placa. Para a purificação da cultura e crescimento em cultura axênica (monoclonal), repiques consecutivos são realizados e, em alguns casos, com associação de antifúngicos e antibacterianos. Mesmo após a cultura purificada e o crescimento em cultura axênica, as placas de isolamento primário são mantidas, na maioria dos casos (Schuster FL, 2002). No nosso caso, não foram realizadas tentativas de clonagem através de coleta por micro manipulação. Portanto, em cada repique realizado para manutenção das culturas persistia a contaminação, especialmente nas amostras provenientes do solo. Entretanto, o estoque do isolamento primário e dos repiques permanece viável para clonagens futuras.

Amostras ambientais sempre são muito contaminadas. No nosso caso, houve maior contaminação nas amostras de solo do que nas de piscina. Esse fato deveu-se, provavelmente, ao tratamento das piscinas com cloro, o que pode ter diminuído as populações de fungos e bactérias. Contudo, a contaminação das amostras de solo não impossibilitou a visualização e a documentação das formas evolutivas das amebas. Não foram realizadas tentativas de purificação das culturas por antifúngicos ou antibacterianos para preservar as amebas inicialmente isoladas e para não diminuir as populações de Amebas de Vida Livre.

Nerad e colaboradores (Nerad et al, 1983) descreveram um meio de cultura definido para espécies patogênicas de *Naegleria*, uma vez que há diferenças na demanda nutricional de espécies patogênicas e não patogênicas. Para as espécies não patogênicas, há a necessidade de maior aporte nutricional. No gênero *Acanthamoeba*, na maioria das vezes espécies patogênicas e não patogênicas apresentam um bom crescimento no mesmo meio de cultura. O meio de cultura que melhor proporciona o crescimento de *Acanthamoeba* é o PPYG (proteose peptona ou peptona, extrato de levedura e glucose). As concentrações dos componentes desse meio podem variar (Schuster FL, 2002). Aqui no Brasil, em 1979 a professora Dra. Annette Silva Foronda, em sua tese de doutoramento, relatou a viabilidade do uso do meio de cultura ágar-infusão de soja (Foronda AS, 1979). A autora comparou o crescimento de amebas em diversos meios de cultura e constatou a eficácia do ágar-soja descrito por ela. No nosso caso, através de uma atividade de treinamento com a professora Dra. Annette Silva Foronda, em Janeiro de 2005, aprendemos a preparação do meio e seu uso, e confirmamos a sua eficácia, viabilidade e baixo custo. Devido a estes fatores, utilizamos somente o meio ágar soja para o isolamento primário e manutenção das culturas de Amebas de Vida Livre. Apesar da não utilização da camada de *E. coli* mortas pelo calor, as amebas cresceram satisfatoriamente em ágar-soja, conforme já havia sido constatado (Foronda AS, 1979).

Quanto à classificação morfológica, Pussard & Pons (Pussard & Pons, 1977) dividiram 18 espécies de *Acanthamoeba* em três grupos (I, II e III) baseados no tamanho e na morfologia dos cistos. Dentre essas espécies, 15 foram descritas como patogênicas. No nosso caso, em 8 dos 13 isolados foram identificadas formas evolutivas do gênero *Acanthamoeba*. Com base no trabalho de Pussard & Pons, os cistos foram medidos e a contagem de braços foi realizada a fresco em exame direto dos lavados das superfícies da culturas, entre lâmina e lamínula, ao microscópio óptico de luz incidente com aumento de 1000X. Os resultados, portanto, sugeriram que os cistos encontrados pertenceriam aos grupos II e III. Estes grupos são morfológicamente muito próximos e estão entre os isolados mais freqüentes de infecções humanas. O parâmetro utilizado por nós foi somente o morfológico. Pussard & Pons utilizaram a técnica do micro cultivo para a contagem de braços do endocisto e Page (Page FC, 1988) afirma que a morfologia dos cistos depende das condições da cultura. No nosso estudo, foi possível observar os braços no exame direto e inclusive contá-los. Portanto, as características morfológicas, são de extrema importância, mesmo quando se dispõem de outras

ferramentas, como as moleculares. Tsvetkova e colaboradores obtiveram a confirmação dos gêneros identificados morfológicamente através do uso de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) (Tsvetkova et al, 2004). Sabendo, entretanto, das limitações da identificação baseada somente em características morfológicas, apenas sugerimos que os cistos pertençam aos grupos citados acima.

A identificação específica do gênero *Acanthamoeba* ainda representa um problema, pois até hoje não há um consenso final. Sabe-se, também que representantes da mesma espécie podem diferir entre si quanto à patogenicidade. Portanto, desde a época de Pussard & Pons, tentativas têm sido feitas com este objetivo e a análise da seqüência do gene 18S rRNA tem-se mostrado um método bastante promissor (Walochnik et al, 2000). No Distrito Federal, o nosso trabalho é a primeira tentativa de isolamento primário e caracterização fenotípica de Amebas de Vida Livre em amostras ambientais.

A caracterização morfológica de Pussard & Pons representa a classificação tradicional do gênero *Acanthamoeba*. A distribuição das mais de 20 espécies nos três grupos morfológicos deixou um vasto campo para ser explorado em relação à identificação específica e genotípica. Recentemente, iniciou-se o uso da técnica do seqüenciamento do gene 18S rRNA para a divisão das espécies de *Acanthamoeba* em genótipos (subtipos). Até hoje, 14 genótipos seqüenciais já foram identificados e denominados de T1 a T14 (Gast et al, 1996; Stothard et al., 1998; Horn et al, 1999; Gast RJ, 2001). O subtipo que apresenta maior diversidade de espécies é o T4 e grupo morfológico mais encontrado neste subtipo é o II, mostrando correspondência entre o genótipo T4 e o grupo morfológico II mencionado. O subtipo T4 e o grupo morfológico II geralmente compreendem espécies envolvidas em infecções em seres humanos (ceratite e encefalite amebiana granulomatosa). O seqüenciamento do gene 18S rRNA tem sido amplamente utilizado, inclusive em tentativas de descobertas de novos genótipos. Na Austrália, Hewett e colaboradores (Hewett et al, 2003) descreveram um novo subtipo, o T15, que reúne 6 cepas de *Acanthamoeba* provenientes do meio ambiente.

Apesar da morfologia dos cistos não indicar informações sobre os subtipos, este parâmetro representa a fase preliminar de identificação pelo gene 18S rRNA, pois a análise prévia das características morfológicas e a classificação nos grupos de Pussard & Pons são de extrema valia para a identificação. Em nosso estudo, concluímos a

primeira etapa de identificação e esperamos dar continuidade ao trabalho até a identificação dos genótipos aos quais pertencem os isolados.

Na identificação morfológica e na documentação de Amebas de Vida Livre sempre é relatado o uso do microscópio invertido, bem como dos microscópios ópticos de contraste de fases, contraste de interferência e de luz incidente (Walochnik et al, 2000a, 2000b). Esta prática deve-se ao fato de as características morfológicas das formas evolutivas dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria* poderem ser facilmente visualizadas ao microscópio óptico. Pussard & Pons (Pussard & Pons, 1977) utilizaram microscopia de contraste de fases, contraste de interferência e luz incidente na classificação dos grupos morfológicos. Até hoje essa metodologia é empregada devido, principalmente, a sua eficácia, aos recursos laboratoriais e à morfologia característica dos cistos de *Acanthamoeba*.

Na morfologia dos cistos de *Acanthamoeba* destacamos a documentação da parede externa (ectocisto), da parede interna (endocisto) com várias formas e também de prolongamentos do endocisto (braços – de acordo com Pussard & Pons, 1977). A biometria dos cistos a contagem dos braços do endocisto foram realizadas satisfatoriamente utilizando-se microscopia de luz incidente com aumento de 1000X. Através dessas características demonstradas, sugerimos os grupos morfológicos de Pussard & Pons pertinentes a cada isolado.

Durante a classificação morfológica, encontramos dificuldade na diferenciação entre os grupos II e III. O mesmo fato é relatado por outros autores que atribuem essa dificuldade principalmente ao polimorfismo intraespecífico e à proximidade morfológica dos grupos II e III (Walochnik et al, 2000a). Estes dois grupos possuem cistos menores que 18µm, que foi o tamanho que encontramos nos nossos isolados. No grupo III, a morfologia dos cistos é descrita como arredondada e sem braços do endocisto e poros visíveis (abertura do endocisto). Os cistos que possuem de 4 a 7 braços pertencem ao grupo II. Pussard & Pons reúnem também neste grupo cistos sem nenhum braço. Então, no nosso trabalho houve uma superposição entre cistos que não possuem braços do grupo II e os cistos do grupo III. Essa superposição sugere que poderia haver mais de uma população de espécies de *Acanthamoeba* nos isolados. Por isso sugerimos que esses isolados poderiam pertencer aos dois grupos ao mesmo tempo.

O gênero *Naegleria* possui como uma de suas características a capacidade de transformação do trofozoíto em forma flagelada, o que também pode ser induzido “in vitro”. No entanto, essa transformação não é obrigatória para todas as cepas do gênero.

Há relato de duas cepas que não formam flagelos em condições laboratoriais e algumas cepas da espécie *Naegleria fowleri* de um local na França nunca foram documentadas na forma flagelada (De Jonckheere JF, 2002; Schuster et al, 2004). No nosso caso, ainda não conseguimos visualizar a forma flagelada. No entanto, as características morfológicas levaram-nos a sugerir a presença do gênero *Naegleria* em alguns dos isolados. O fato dessas formas não terem sido visualizadas não descarta a presença das mesmas, nem a possibilidade de haver algumas espécies que não apresentam essa forma no seu ciclo biológico. A identificação específica e tentativas posteriores de indução de flagelação para confirmação da presença ou ausência dessa fase evolutiva serão realizadas posteriormente.

A clonagem consiste em repiques sucessivos para obtenção de uma única população de amebas. No nosso caso, não foram realizadas tentativas de clonagem, uma vez que o objetivo era observar características morfológicas. No entanto, os estoques de isolamento primário permanecem viáveis e estão sendo mantidos em placas de ágar-soja vedadas com parafilm, incubadas a 25°C e repicadas sempre que há grande quantidade de cistos na placa com o objetivo de realizar clonagens e identificação específica para futuros estudos moleculares.

A presença dos gêneros de Amebas de Vida Livre potencialmente patogênicas no meio ambiente, como fator isolado, não significa indução de doenças em seres humanos, uma vez que a patogenicidade e a virulência dessas amebas dependem de outros fatores, como: temperatura, capacidade de permanência na mucosa, imunidade da mucosa, imunodeficiência e dose (Ferrante A., 1991).

As Amebas de Vida Livre exercem importante papel como abrigo de bactérias endossimbióticas. O gênero *Acanthamoeba* é o mais freqüentemente relatado como vetor de bactérias, como a *Legionella sp*, causadora da legionelose. Essa bactéria foi recentemente isolada de *Acanthamoeba* proveniente de amostras de solo (Newsome et al, 1998). Conforme descrito anteriormente no nosso trabalho, houve maior freqüência do gênero *Acanthamoeba* nos isolados de solo. Outras bactérias patogênicas ou potencialmente patogênicas também têm sido descritas em associação com *Acanthamoeba*, as quais são: *Micobacterium avium*, *Afipia felis*, *Listeria monocytogenes*, *Burkholderia pseudomallei*, *Escherichia coli*, *Chlamydia sp* e *Chlamydia-like* bactéria e *Vibrio cholerae* (Greub et al, 2004). No entanto, não podemos afirmar sobre a presença de bactérias no interior dos trofozoítos encontrados, pois ainda não realizamos nenhum estudo para análise de Amebas de Vida Livre como

veiculadores, visto não ser o foco principal do trabalho. Porém, estudos posteriores poderão analisar o potencial dessas amebas para veicular outros microorganismos.

Uma atenção especial deve ser dada ao papel das amebas como vetores de patógenos. O gênero *Vanella* não possui nenhum relato na literatura de patogenicidade, no entanto, pode carregar alguns patógenos. Hoffmann e colaboradores relataram a presença de um organismo *Microsporidian-like* “KW19” dentro de *Vanella* proveniente de amostras de água de torneira (Hoffmann et al, 1998). No nosso trabalho, o gênero foi facilmente identificado através da forma flutuante, característica de *Vannella*.

A presença de formas evolutivas de outras amebas também foi observada sem, entretanto, tentativas de caracterização morfológica, pois a ênfase do estudo foi realmente em dois dos gêneros com espécies potencialmente patogênicas, ou seja, *Acanthamoeba* e *Naegleria*.

## 6. COMENTÁRIOS FINAIS

O estudo representa uma grande conquista devido ao pioneirismo do relato de isolamento de Amebas de Vida Livre no Distrito Federal e na Região Centro – Oeste.

Embora se tenha realizado um levantamento inicial nos 2 ambientes pesquisados, reconhecemos a necessidade de aprofundar o conhecimento desses protozoários anfitriais que certamente também são freqüentes em outros locais e em outras amostras ambientais.

Uma extensão desses estudos, através da associação dos parâmetros fenotípicos já descritos com o planejamento de outros que caracterizem o potencial patogênico, é necessária. A infecção em modelos experimentais, experimentos “in vitro” de osmotolerância e termotolerância e, finalmente, a aplicação de ferramentas de caracterização molecular contribuiu extremamente para o melhor conhecimento das Amebas de Vida Livre presentes no nosso meio.

Apesar de dispormos de excelente aporte de material para o estudo, enfrentamos algumas dificuldades na obtenção de recursos humanos, uma vez que as coletas e o processamento do material foram realizados na sua totalidade pela autora.

O produto deste estudo, ainda que preliminar, possibilitou a identificação de dois dos gêneros que possuem espécies potencialmente patogênicas de grande relevância em Saúde Pública.

## 7. CONCLUSÕES

- O presente trabalho é o primeiro relato na literatura de isolamento de Amebas de Vida Livre no Distrito Federal e na região Centro-Oeste.
- Os ambientes pesquisados demonstraram a presença de Amebas de Vida Livre no Distrito Federal, o que confirmou os relatos da literatura de isolamento dessas amebas em diversos habitats, incluindo solo e água de diversas partes do mundo.
- O emprego das técnicas tradicionais permitiu o isolamento primário e o cultivo das Amebas de Vida Livre isoladas.
- Através da microscopia óptica, foi possível sugerir a identificação dos gêneros, bem como evidenciar características morfológicas das formas evolutivas encontradas.
- Apesar da utilização de técnicas moleculares nos dias atuais, a classificação morfológica de Pussard & Pons é imprescindível para caracterização do gênero *Acanthamoeba*. Sua utilização foi acessível e de extrema importância. A sugestão dos grupos morfológicos aos quais os isolados positivos para *Acanthamoeba* poderiam pertencer merece atenção especial, bem como o aprofundamento dos estudos e a utilização de outros parâmetros, sobretudo para a identificação específica.
- A morfologia dos cistos do gênero *Naegleria* é bem característica, embora não tenha sido necessariamente adicionada a demonstração das formas flageladas, sugerimos a presença do gênero em alguns dos isolados.
- A visualização das formas evolutivas das amebas de vida possibilitou a documentação fotográfica, uma ferramenta extremamente importante que facilitou a sugestão dos gêneros encontrados.
- A manutenção das culturas de Amebas de Vida Livre para estudos posteriores, permitiu-nos a formação de uma coleção biológica que vem sendo mantido através de repiques com crescimento satisfatório ao longo de dois anos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Booton GC, Carmichael JR, Visvesvara GS, Byers TJ, Fuerst PA. Genotyping of *Balamuthia mandrillaris* based on nuclear 18S and mitochondrial 16S rRNA genes. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 Jan;68(1):65-9.

Brown TM, Cursons RTM, Keys EA. Amoebae from antarctic soil and water. *Appl Environ Microbiol.* 1982 Aug;44(2):491-3.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta; [atualizada em 2006 Oct 26; acesso em 2006 Oct 01]. Free-Living amebic infections; [aproximadamente 2 telas]. Disponível em: [http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/FreeLivingAmebic.asp?body=Frames/A-F/FreeLivingAmebic/body\\_FreeLivingAmebic\\_page1.htm](http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/FreeLivingAmebic.asp?body=Frames/A-F/FreeLivingAmebic/body_FreeLivingAmebic_page1.htm)

Chaves CM. Condições sanitárias de águas de piscinas de Campo Grande, Mato Grosso do Sul / Sanitary conditions of swimming pool waters of Campo Grande, Mato Grosso do Sul. São Paulo [tese de doutorado]. São Paulo: Departamento de Saúde Ambiental da Universidade de São Paulo, 1984.

Clarke DW, Niederkorn JY. The pathophysiology of acanthamoeba keratitis. *Trends Parasitol.* 2006 Apr;22(4):175-80.

Culbertson CG, Smith JW, Minner JR. *Acanthamoeba*: observations on animal pathogenicity. *Science.* 1958 Jun 27;127(3313):1506.

De Jonckheere JF. Taxonomy. In: Rondanelli EG, editor. *Amphizoic amoebae: human pathology*. Padua, Italy: Piccin Nuova Libreria; 1987. p.127-47.

De Jonckheere JF. A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozool.* 2002;41:309-42.

De Jonckheere JF. Pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba* spp. In thermally polluted discharges and surface waters. *J Protozool.* 1981;28:56-9.

Duarte AG, Sattar F, Granwehr B, Aronson JF, Lick S. Disseminated acanthamoebiasis after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2006 Feb;25(2):237-40.

Dubey JP, Benson JE, Blakeley KT, Booton GC, Visvesvara GS. Disseminated *Acanthamoeba sp* infection in a dog. *Vet Parasitol.* 2005 Mar 31;128(3-4):183-7.

Ferrante A. Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. *Parasite Immunol.* 1991 Jan;13(1):31-47.

Foronda AS, Bazito Filho O, Rocha AA, Branco SM. Aspectos ecológicos de Amebas de Vida Livre em piscinas de São Paulo. Reunião da Sociedade Brasileira de Protozoologia; Caxambu, MG; 1985.

Foronda AS. Observações sobre Amebas de Vida Livre potencialmente patogênicas [tese de doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1979.

Fowler M, Carter RF. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba sp*: a preliminary report. *Br Med J.* 1965 Sep 25;2(5464):740-2.

Gast RJ., Ledee DR., Fuerst PA., Byers TJ. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *J Eukaryot Microbiol.* 1996 Nov-Dec;43(6):498-504.

Gast RJ. Development of an *Acanthamoeba*-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. *J Eukaryot Microbiol.* 2001 Nov-Dec;48(6):609-15.

Giazzi JF, Buainain A, Rosa JA, Martini AS, Belda NFM, Martinez I, et al. Free-living amoebas isolation in recreation sand tanks for children in Araraquara city. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; Rio de Janeiro; 1995.

Giazzi JF. Contribuição para o estudo do isolamento, cultivo e manutenção das Amebas de Vida Livre [tese de livre-docência]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de São Paulo, 1996.

Górnik K, Kuzna-Grygiel W. Presence of virulent strains of amphizoic amoebae in swimming pools of the city of Szczecin. *Ann Agric Environ Med.* 2004;11(2):233-6.

Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. [Clin Microbiol Rev.](#) 2004 Apr;17(2):413-33.

Griffin JL. Temperature tolerance of pathogenic and non-pathogenic free-living amoebas. *Science*. 1972 Nov;178(4063): 869-70.

Hewett MK, Robinson BS, Monis PT, Saint CP. 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*. 2003;42: 325-9.

Hoffmann R, Michel R, Schmid EN, Müller KD. Natural infection with microsporidian organisms (KW19) in *Vannella sp* (Gymnamebia) isolated from a domestic tap-water supply. *Parasitol Res*. 1998;84(2):164-6.

Hoffmann R, Michel R. Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water. [Int J Hyg Environ Health](#). 2001 Mar;203(3):215-9.

Horn M, Fritsche TR, Gautom RK, Schleifer KH, Wagner M. Novel bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba spp* related to the *Paramecium caudatum* symbiont *Caedibacter caryophilus*. *Environ Microbiol*. 1999 Aug;1(4):357-67.

Jager BV, Stamm WP. Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *Lancet*. 1972 Dec 23;2(7791):1343-5.

Jones DB, Visvesvara GS, Robinson NM. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and acanthamoeba uveitis associated with fatal meningoencephalitis. *Trans Ophthalmol Soc U K*. 1975 Jul;95(2):221-32.

Kilvington S, White DG. Rapid identification of thermophilic *Naegleria*, including *Naegleria fowleri* using API ZYM system. *J Clin Pathol*. 1985 Nov;38(11):1289-92.

Kingston D, Warhust DC. Isolation of amoebae from the air. *J Med Microbiol*. 1969 Feb;2(1):27-36.

Lima DM, Salazar HC, Carvalho FG. Gênero *Acanthamoeba*: evidências de uma nova espécie de Ameba de Vida Livre isolada no Rio de Janeiro. Reunião da Sociedade Brasileira de Protozoologia; Caxambu, MG; 1985.

Lorenzo-Morales J, Monteverde-Miranda CA, Jiménez C, Tejedor ML, Valladares B, Ortega-Rivas A. Evaluation of *Acanthamoeba* isolates from environmental sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Ann Agric Environ Med*. 2005b;12(2):233-6.

Lorenzo-Morales J, Ortega-Rivas A, Foronda P, Martinez E, Valladares B. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitol Res.* 2005a Mar;95(4):273-7.

Ma P, Visvesvara GS, Martinez AJ, Theodore FH, Daggett PM, Sawyer TK. *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections: review. *Rev Infect Dis.* 1990 May-Jun;12(3):490-513.

Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba spp* as Agents of Disease in Humans. *Clin Microbiol Rev.* 2003 Apr;16(2):273-307.

Martinez AJ, Visvesvara GS. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol.* 1997 Jan;7(1):583-98.

Mazur T, Hadas E, Iwanicka I. The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Trop Med Parasitol.* 1995;46:106-8.

Michel R, Menn T. *Acanthamoeba*, *Naegleria* and invertebrates in wet areas of physiotherapy equipment in hospitals. *Zentralbl Hyg Umweltmed.* 1991 Apr;191(4):423-37.

Moura H, Lima DM, Salazar HC. Isolamento de Amebas de Vida Livre em locais com poluição térmica no Rio de Janeiro. *Reunião da Sociedade Brasileira de Protozoologia; Caxambu, MG; 1985.*

Munõz V, Reyes H, Toche P, Cárcamo C, Gottlieb B. Aislamiento de amebas de vida libre en piscinas públicas de Santiago de Chile. *Parasitol Latinoam.* 2003 Jul;58(3-4):106-11.

Nacapunchai D, Kino H, Ruangsitticha C, Sriwichai P, Ishih A, Tera M. A brief survey of free-living amebae in Thailand and Hamamatsu District, Japan. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2001;32 Suppl 2:179-82.

Naginton J, Watson PG, Playfair TJ, McGill J, Jones BR, Steele AD. Amoebic infection of the eye. *Lancet.* 1974 Dec 28;2(7896):1537-40.

Nerad TA, Visvesvara G, Daggett PM. Chemically defined media for the cultivation of *Naegleria*: pathogenic and high temperature tolerant species. *J Protozool.* 1983; 30:383-7.

Newsome AL, Scott TM, Benson RF, Fields BS. Isolation of an amoeba naturally harboring a distinctive *Legionella* species. *Appl Environ Microbiol.* 1998 May;64(5):1688-93.

Page FC. A further study of taxonomic criteria for *Limax* amoebae, with descriptions of new species and a key to genera. *Arch Protistenkd.* 1974;116:S149.

Page FC. An illustrated key to freshwater and soil amoebae. Ambleside: Freshwater Biological Association; 1976.

Page FC. A new key to freshwater and soil *gymnamoebae*. Ambleside: Freshwater Biological Association; 1988.

Pussard M, Pons R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica.* 1977;8:557-98.

RDC nº 77. Considerando a necessidade de atualizar as normas e procedimentos referentes ao registro de produtos saneantes domissanitários e outros de natureza e finalidades idênticas, bom base na Lei 6306/76 e seu Regimento Decreto 79.094/77, de 1977. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 17 abril 2001.*

Rivera F, Lares F, Gallegos E, Ramirez E, Bonilla P, Calderon A, et al. Pathogenic amoebae in natural thermal waters of three resorts in Hidalgo, México. *Environ Res.* 1989 Dec;50(2):289-95.

Rivera F, Ramirez E, Bonilla P, Calderón A, Gallegos E, Rodriguez S, et al. Pathogenic and free-living amoebae isolated from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. *Environ Res.* 1993 Jul;62(1):43-52.

Rodriguez-Zaragoza S, Magana-Becerra A. Prevalence of pathogenic *Acanthamoeba* (Protozoa: Amoebidae) in the atmosphere of the city of San Luis Potosi, Mexico. *Toxicol Ind Health.* 1997 Jul-Aug;13(4):519-26.

Rodriguez-Zaragoza S, Rivera F, Bonilla F, Ramirez E, Gallegos E, Calderon A, et al. Amoebological study of the atmosphere of San Luis Potosi, SLP, Mexico. *J Expo Anal Environ Epidemiol.* 1993;3 Suppl 1:229-41.

Rohr U, Weber S, Michel R, Selenka F, Wilhelm M. Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Appl Environ Microbiol.* 1998 May;64(5):1822-4.

Salazar HC, Moura H, Ramos RT. Isolamento de Amebas de Vida Livre a partir de água mineral engarrafada. *Rev. Saúde Públ.* 1982;16:261-7.

Sawyer TK, Griffin JL. A proposed new family, *Acanthamoebidae*, n. fam. (order Amoebida) for certain cyst-forming filose amoebae. *Trans Am Microsc Soc.* 1975 Jan; 94(1):93-8.

Scaglia M, Gati S, Brustia R, Strosselli M, Bernuzzi AM, Cevini C. Pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba spp* a new autochthonous isolate from an Italian thermal area. *Microbiologica.* 1987 Apr;10(2):171-82.

Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Invited review. *Int J Parasitol.* 2004b Aug;34(9):1001-27.

Schuster FL, Visvesvara GS. Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment: review. *Drug Resist Updat.* 2004a Feb;7(1):41-51.

Schuster FL. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Jul;15(3):342-54.

Sheehan KB, Fagg JA, Ferris MJ, Henson JM. PCR detection and analysis of the free-living amoeba *Naegleria* in hot springs in Yellowstone and Grand Teton National Parks. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Oct; 69(10):5914-18.

Silva MA, Rosa JA. Isolamento de Amebas de Vida Livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. *Rev Saúde Pública.* 2003;37(2):242-6.

Singh BN, Das SR. Intra-nasal infection of mice with flagellate stage of *Naegleria aerobia* and its bearing on the epidemiology of human meningoencephalitis. *Curr Sci.* 1972;41:625-8.

Singh BN, Das SR. Studies on pathogenic and non-pathogenic small free-living amoebae and the bearing of nuclear division on the classification of the order Amoebida. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1970 Oct;259(832):435-76.

Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodriguez-Zaragoza S, et al. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J Eukaryot Microbiol.* 1998 Jan-Feb;45(1):45-54.

Szenasi Z, Endo T, Yagita K, Nagy E. Isolation, identification and increasing importance of 'free-living' amoebae causing human disease. *J Med Microbiol.* 1998 Jan;47(1):5-16.

Tsvetkova N, Schild M, Panaiotov S, Kurdova-Mintcheva R, Gottstein B, Walochnik J, et al. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol Res.* 2004 Mar;92(5):405-13.

Visvesvara GS, Balamuth W. Comparative studies on related free-living and pathogenic amoebae with special reference to *Acanthamoeba*. *J Protozool.* 1975 May;22(2):245-56.

Visvesvara GS, Martinez AJ, Schuster FL, Leitch GJ, Wallace SV, Sawyer TK et al. *Leptomyxid* ameba, a new agent of amebic meningoencephalitis in humans and animals. *J Clin Microbiol.* 1990 Dec;28(12):2750-56.

Visvesvara GS, Schuster FL, Martinez AJ. *Balamuthia mandrillaris*, N.G., N. Sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J Euk Microbiol.* 1993 Jul-Aug;40(4):504-14.

Visvesvara GS. Pathogenic and opportunistic free-living amebae. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology.* Washington, DC: ASM Press; 1999. p. 1383-90.

Volkonsky M. *Hartmannella castellanii*. Douglas et classification des Hartmannelles. *Arch Zool Exp Gen.* 1931;72:317-39.

Walochnik J, Haller-Schober EM, 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.* 2000b Nov;38(11):3932-6.

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.* 2000a Oct;66(10):4408-13.

Zettler LAA, Nerad TA, O'Kelly CJ, Peglar MT, Gillevet PM, Silberman JD et al. A molecular reassessment of the Leptomyxid amoebae. *Protist*. 2000 Oct;151(3):275-82.

**ANEXO I: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.**

**Universidade de Brasília**  
**Pós-graduação em Ciências da Saúde**

Projeto de Tese de Mestrado em Ciências da Saúde:

“Isolamento e caracterização morfológica de Amebas de Vida Livre em amostras de solo e água de piscina no Distrito Federal.”

Laboratório de Parasitologia

Aluna: Daniella de Sousa Mendes Moreira Alves.

Matrícula UnB: 04/97827

Orientador: Prof. Dr. César Augusto Cuba Cuba.

## **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

A água, em geral, é um habitat potencial para diversos microorganismos, dentre eles, os protozoários de vida livre. Sabe-se também que alguns destes protozoários são resistentes ao tratamento de rotina da água.

O nosso trabalho tem por objetivo verificar a existência destes seres unicelulares nas águas de piscinas do Distrito Federal, bem como caracterizá-los segundo a sua morfologia. A pesquisa contribuirá para o melhor conhecimento sanitário desses ambientes.

Portanto, através deste, vimos solicitar a permissão para a realização de coletas de água das piscinas do estabelecimento em frascos estéreis de 200mL para a pesquisa da fauna existente.

Enfatizamos que a adesão é voluntária e garantimos o sigilo total dos resultados, os quais estarão à disposição do estabelecimento para consultas em qualquer momento.

Deixamos também esclarecida a possibilidade de desistência da participação no projeto em qualquer momento.

Aguardamos a análise da solicitação e relativa urgência no deferimento.

Atenciosamente,

---

Assinatura do orientador

---

Assinatura do responsável pela autorização

**ANEXO II: RESUMO APRESENTADO NA I JORNADA CIENTÍFICA  
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UnB.**



Universidade de Brasília  
 Faculdade de Ciências da Saúde  
 Faculdade de Medicina  
 Hospital Universitário de Brasília



IX Jornada Científica do Hospital Universitário de Brasília  
 VI Feira de Saúde • I Jornada Científica da Faculdade de Medicina  
 I Jornada Científica da Faculdade de Ciências da Saúde

# ANAI S 2006

Faculdade de Medicina  
 Faculdade de Ciências da Saúde

*Integrando a área da saúde da UnB!*



Apoio:



ação das insulinas exógenas que utiliza (164%, 78%); Nível de aproveitamento nas consultas à equipe de saúde (84%, 85%), Compreensão sobre a importância de realizar exames laboratoriais (58%, 88%); Controle Glicêmico: Esquema de insulinização adequado para manutenção do modo de vida (118%, 74%); Capacidade para manejar aspectos interferentes sobre glicemia (116%, 74%); Eventos hiper e hipoglicêmicos intensos (redução de 114%, 62%); Alimentação: Segurança no consumo de açúcares (187%, 74%); Observação dos nutrientes presentes nas refeições (180%, 64%); Capacidade para distinguir os efeitos de tipos e quantidades de CHO (138%, 65%), Nível de conhecimentos para regular a dieta com segurança (82%, 76%); Atividades Físicas: Aprendizado de efeitos glicêmicos sob distintas condições de exercícios (141%, 88%); Capacidade de avaliar ajustes glicêmicos para atividades físicas (140%, 69%), Entendimento sobre a possibilidade de hipoglicemia tardia induzida por exercício (97%, 84%); Autocuidados: Transporte sempre do glicosímetro consigo (290%, 78%); Disponibilidade de glucagon e pessoal treinado para usá-lo (332%, 60%); Capacidade para ajuste insulínico (194%, 73%); Frequência de monitorização glicêmica (182%, 48%); Aspectos que observa em autocuidados (88%, 83%); Conhecimento e Vivência: Nível de conhecimentos sobre DM (111%, 76%); Compreensão e confiança no tratamento (94%, 74%); Motivação para buscar longevidade e qualidade de vida (80%, 82%). Na questão 38, vários comentários livres foram feitos ilustrando como os participantes avaliam os resultados de sua participação neste programa.

**CONCLUSÃO:** Incluindo que 40% do grupo não mais freqüentava o PROAFIDI quando da coleta de dados, conclui-se que este foi extremamente eficaz em promover mudanças positivas sustentadas em comportamentos para o controle da DM, sendo indicado para a Educação em Diabetes. Destaca-se, em especial, que pelos dados coletados pode-se esperar que o grupo avaliado apresente muito melhores condições

## 5. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS GÊNEROS ACANTHAMOEBA E NAEGLERIA (PROTOZOA, AMOEBIDA) EM AMOSTRAS DE SOLO E ÁGUA DE PISCINA NO DISTRITO FEDERAL.

Daniella de Sousa Mendes Moreira Alves; Lizete Muñoz; Victor Muñoz & César Augusto Cuba Cuba.  
Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina / Unidade de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores.  
Orientador do Programa de Mestrado em Ciências da Saúde.

**Justificativa:** As amebas de vida livre são protozoários unicelulares encontrados tanto em solo úmido quanto em ambientes aquáticos. Desenvolvem-se no meio ambiente em solo, poeira e ar; em locais com água sem movimentação, em piscinas, lagos e represas; em soluções de limpeza de lentes de contato; em esgotos, unidades de ar-condicionado, aquecimento e ventilação e lavado intestinal. Os gêneros com relevância em Saúde Pública são Naegleria, Acanthamoeba, Balamuthia e, mais recentemente, Sappinea e Hartmanella. Considerando o reconhecido impacto em Saúde Pública, foi feito um levantamento em Brasília (Distrito Federal) para determinar a presença em amostras ambientais principalmente dos gêneros Acanthamoeba spp e Naegleria spp. Os ambientes de procedência das amostras foram solo de jardins e piscinas ao ar livre.

**Métodos:** Foram coletadas 15 amostras de solo e 28 de piscinas para tentativas de isolamento dos dois gêneros. Observações a fresco das amostras previamente concentradas e culturas in vitro foram realizadas. As amostras positivas para o gênero Acanthamoeba spp foram submetidas à classificação nos grupos I, II e/ou III de Pussard & Pons (1977). Os cistos dos dois gêneros foram medidos ao microscópio óptico de luz incidente calibrado com ocular micrométrica e aumento de 1000 vezes. As formas evolutivas foram documentadas na caracterização fenotípica. **Resultados:** De acordo com a presença de maior quantidade de formas evolutivas, 12 isolados foram selecionados dentre as amostras positivas para Acanthamoeba spp e Naegleria spp e nomeados em UnB 1 a UnB 12. Os isolados UnB 1 a UnB 6 foram originados de amostras de solo e os isolados UnB 7 a UnB 12, de piscinas. Todos os isolados exibiram uma alta e eficiente proliferação em meio de cultura não definido, ágar – soja, a 25°C. Foram identificadas fenotipicamente 8 (18%) amostras positivas para Acanthamoeba spp com morfologia similar aos grupos II e III (baseados no tamanho dos cistos) e 11 (25%) para Naegleria spp. Além dos dois citados acima, o gênero Vannella spp também foi encontrado em 2 (4%) amostras. Foi registrada também a sobrevivência e viabilidade de cistos de Acanthamoeba spp nos isolados ao longo de, aproximadamente, 1 ano. As seguintes formas evolutivas foram documentados por fotografia digital: cistos e trofozoítos de Acanthamoeba spp, cistos e trofozoítos de Naegleria spp e forma flutuante de Vannella spp. Não foi possível demonstrar a presença de formas flageladas de Naegleria spp.

**Conclusão:** Concluímos que, conforme a literatura especializada, os gêneros Acanthamoeba spp e Naegleria spp são freqüentes na natureza, especialmente nos ambientes pesquisados. A caracterização das espécies e o potencial patogênico das mesmas deverá ser estudado posteriormente para as recomendações de medidas de profilaxia.