

DANIELLA DE SOUSA MENDES MOREIRA ALVES

**AVANÇOS NO ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E  
MOLECULAR DE *Acanthamoeba* spp (ACANTHAMOEBIDAE) –  
AMEBA DE VIDA LIVRE: DETERMINAÇÃO EXPERIMENTAL DO  
POTENCIAL PATOGÊNICO**

Brasília, DF

2012

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DANIELLA DE SOUSA MENDES MOREIRA ALVES

**AVANÇOS NO ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E  
MOLECULAR DE *Acanthamoeba* spp (ACANTHAMOEBIDAE) –  
AMEBA DE VIDA LIVRE: DETERMINAÇÃO EXPERIMENTAL DO  
POTENCIAL PATOGÊNICO**

Tese apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do Título de Doutor em  
Ciências da Saúde pelo Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da  
Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. César Augusto Cuba Cuba

Brasília, DF

2012

DANIELLA DE SOUSA MENDES MOREIRA ALVES

**AVANÇOS NO ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE *Acanthamoeba* spp (ACANTHAMOEBIDAE) – AMEBA DE VIDA LIVRE: DETERMINAÇÃO EXPERIMENTAL DO POTENCIAL PATOGÊNICO**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Brasília, DF, 30 de março de 2012

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. César Augusto Cuba Cuba (presidente)  
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Silvia Celina Alfieri  
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Andrea Queiroz Maranhão  
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Marco Tulio Antonio Garcíazapata  
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero  
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Riccardo Pratesi  
Universidade de Brasília

*Dedico este trabalho*

*Ao meu filho, Pedro, e ao meu esposo,  
Luciano, expressões maiores do amor de  
Deus por mim.*

*Aos meus pais, José Mendes e Valdina,  
que proporcionaram a base de minha  
educação.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, cujo fôlego de vida permite a minha trajetória.

Ao meu orientador, Prof. Dr. César Augusto Cuba Cuba, pelo exemplo científico, sabedoria e paciência na orientação deste trabalho.

Ao colega Prof. Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves, responsável pelo Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores, pela imensa ajuda, atenção e orientação em todas as etapas da realização deste trabalho e pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da Universidade de Brasília, local onde foi realizado o trabalho e de grande importância para a minha vida acadêmica.

Aos membros da banca, Profa. Dra. Silvia Celina Alfieri, Profa. Dra. Andrea Queiroz Maranhão, Prof. Dr. Marco Tulio Antonio Garcíazapata, Prof. Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero e Prof. Dr. Riccardo Pratesi, pelo aceite do convite e pelas contribuições ao trabalho.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero e Profa. Dra. Laila Salmen Espíndola, pelas considerações que levaram ao aprimoramento deste trabalho.

À Profa. Dra. Annete Silva Foronda, pela doação do isolado CorSP e da alíquota da cepa *Escherichia coli* NA22.

Ao Prof. Dr. Fernando da Costa e Silva-Filho, pela doação da alíquota da cepa de referência *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30461.

Ao Prof. Dr. Antonio Raimundo Lima Cruz Teixeira, pela disponibilidade do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas da Universidade de Brasília e dos recursos para a realização da extração do DNA dos isolados ambientais e da técnica de PCR.

À Profa. Dra. Nadjar Nitz Lociks e à Dra. Mariana Machado Hecht, pela atenção, amizade e orientação na execução da técnica de PCR e sequenciamento.

Ao biomédico Adriano Rios, pelo apoio na execução da técnica de PCR.

Ao Prof. Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero, pela disponibilidade do Laboratório de Leishmanioses do Núcleo de Medicina Tropical (UnB) para a extração do DNA do isolado CorSP.

À técnica Renata Sousa, pelo auxílio na extração do DNA do isolado CorSP.

Ao Dr. Marcus de Melo Teixeira, pelo auxílio e orientação no sequenciamento do isolado CorSP.

Ao Laboratório de Biologia Molecular, pelo sequenciamento do isolado CorSP.

À Profa. Dra. Selma Aparecida Souza Kückelhaus, pela atenção, amizade e orientação na execução dos testes de patogenicidade *in vivo* e purificação *in vivo*.

À Profa. Dra. Maria Imaculada Muniz-Junqueira, pela contribuição no experimento de purificação *in vivo*.

À estagiária e amiga Aline Silva Moraes, pelo auxílio, disponibilidade e participação imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À estagiária e amiga Mayara de Oliveira, pelo auxílio nas etapas de execução do trabalho.

A todos os estagiários que passaram pelo laboratório e contribuíram com a execução deste trabalho.

À amiga Dra. Daniella Barreto Santana, pela amizade e apoio desde a época do Mestrado.

À estagiária Aline da Fonseca, pelo apoio na fabricação dos meios de cultura.

À Maria de Lourdes (Lourdinha), técnica do laboratório, pelo apoio.

Ao Laboratório de Cirurgia Experimental, na pessoa da Dra. Gabriela Mariângela Farias, médica veterinária, pelo auxílio no manejo dos animais e confecção das lâminas para os exames histopatológicos.

Ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina, na pessoa da Tércia, pela confecção das lâminas para os exames histopatológicos.

Ao Sr. Dedé, pelo auxílio no cuidado dos animais.

Às técnicas Shirley Couto e Daniela Aquino, do Laboratório de Imunologia, pelo apoio durante os experimentos.

Ao Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Junior, do Laboratório de Patologia da Universidade Federal de Goiás, pelo auxílio na documentação fotográfica da histopatologia.

À querida cidade de Brasília, que me acolheu e me proporcionou o aprimoramento da vida acadêmica durante o tempo em que lá estive.

À Universidade de Brasília, pela oportunidade de realização desta pesquisa.

Aos funcionários da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pela atenção e carinho no atendimento.

À Profa. Me. Suzana Oellers, pelo carinho, dedicação e criteriosa revisão deste trabalho.

A todos os meus amigos e colegas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.

Aos meus pais, pelo auxílio no cuidado do meu bebê durante a execução do trabalho.

Ao meu filho amado, fonte de inspiração.

E, finalmente, ao meu amado esposo, pela motivação, apoio, auxílio e compreensão sempre.

Os meus sinceros agradecimentos.

*“Existo porque encisto”*

*Acanthamoeba*

## RESUMO

Várias espécies do gênero *Acanthamoeba* podem causar ceratite e encefalite amebiana granulomatosa. A avaliação dos critérios de patogenicidade é de grande importância para analisar o risco de infecção. Nossos objetivos foram determinar o potencial patogênico de isolados ambientais de *Acanthamoeba* de Brasília, DF e avaliar uma técnica de purificação de cultivos de *Acanthamoeba*. A análise da sequência do 18S rDNA revelou que: entre os 19 isolados estudados, oito apresentaram similaridade com o genótipo T5, seis com o genótipo T4 e um com o genótipo T2/T6. Os genótipos dos outros quatro isolados não foram determinados. A cepa de referência *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC 30461) serviu de controle. Além disso, 11 isolados (58%) cresceram a 37°C e oito (42%) cresceram em presença de manitol 1,5 M, parâmetros fisiológicos associados com isolados patogênicos de *Acanthamoeba*, enquanto quatro isolados de água de piscina e um de ceratite apresentaram elevado potencial patogênico. Nos testes de patogenicidade *in vivo*, realizados com três isolados e a cepa de referência ATCC 30461, o isolado de córnea foi considerado patogênico e dois isolados ambientais, invasivos. Foi possível reduzir a porcentagem de fungos e bactérias em uma placa de cultura da cepa de referência ATCC 30461 e de bactérias em uma placa de cultura de um isolado de solo com a inoculação na cavidade peritoneal de camundongos. Nossos resultados indicam ampla distribuição de isolados de *Acanthamoeba* spp. similares aos genótipos T4, T5 e T2/T6, classificados como invasivos, em diversos habitats de Brasília, DF, revelando o risco potencial de infecção humana e a necessidade de medidas preventivas.

**Palavras-chave:** *Acanthamoeba*; genótipos T4, T5, T2/T6; amostras ambientais; patogenicidade; Brasília, DF; ATCC 30461.

## ABSTRACT

### **Advances in isolation and biological and molecular characterization of *Acanthamoeba* spp (Acanthamoebidae) – free-living amoeba: experimental determination of pathogenic potential**

Several *Acanthamoeba* species may cause keratitis and granulomatous amebic encephalitis. The evaluation of the criteria of pathogenicity is very important to assess the risk of infection. We aimed to determine the pathogenic potential of environmental isolates of *Acanthamoeba* from Brasília, DF, Brazil, and assess a technique to purify *Acanthamoeba* cultures. Sequence analysis of 18S rDNA revealed that: among the 19 isolates tested, eight were similar to genotype T5, six to genotype T4, and one to genotype T2/T6. The genotypes of the remaining four isolates were not determined. The reference *Acanthamoeba polyphaga* strain (ATCC 30461) was the control. Moreover, 11 strains (58%) presented growth at 37°C and eight (42%) developed in medium containing 1.5 M mannitol, the physiological parameters associated with pathogenic isolates of *Acanthamoeba*, whereas four strains isolated from swimming pool water and one from a patient with keratitis showed high pathogenic potential. *In vivo* pathogenicity tests, performed with three isolates and the reference strain ATCC 30461, showed that the isolate from a patient with keratitis was considered pathogenic and two environmental isolates, invasive. It was possible to reduce the percentage of fungi and bacteria in a culture plate of the reference strain ATCC 30461 and bacteria in a culture plate of one soil isolate by inoculating them into the peritoneal cavity of mice. Our results indicate a wide distribution of *Acanthamoeba* spp. isolates similar to genotypes T4, T5, and T2/T6, classified as invasive, isolated from several habitats of Brasília, DF, revealing the potential risk of human infection and the need for preventive measures.

**Key words:** *Acanthamoeba*; genotypes T4, T5, T2/T6; environmental samples; pathogenicity; Brasília, DF, Brazil; ATCC 30461.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** **A.** Esquema das formas evolutivas do gênero *Acanthamoeba* (14); **B.** Trofozoíto de *Acanthamoeba* entre lâmina e lamínula; (ac): acantopódios (pseudópodes na forma de espinhos); (vc): vacúolo contrátil. Microscópio óptico; aumento: 1000x; cada unidade equivale a 1 µm (15); **C.** Cisto de *Acanthamoeba* entre lâmina e lamínula; (ec): ectocisto (parede externa do cisto); (en): endocisto (parede interna do cisto); (br): braço (prolongamento do endocisto); (os) ostíolo. Microscópio óptico; aumento: 1000x (15). . 20
- Figura 2.** Organograma dos experimentos realizados com os isolados selecionados para a avaliação do potencial patogênico. .... 33
- Figura 3.** Formas de desenvolvimento de um isolado de *Acanthamoeba* proveniente de espelho d'água. **A.** Cistos de *Acanthamoeba* agrupados, ressuspensos em solução de encistamento (80). **B.** Cisto de *Acanthamoeba*; (ec): ectocisto; (en): endocisto; (br): braços do endocisto; (os): ostíolo. **C e D.** Trofozoítos em cultivo axênico com vacúolo (seta em C) e acantopódios (seta em D). Microscópio óptico; aumento: 1000x; escala = 10 µm. .... 55
- Figura 4.** Análise de PCR de isolados de *Acanthamoeba* provenientes de amostras ambientais de Brasília, DF e de ceratite. M: marcador molecular (1 kb ladder plus); 1: controle negativo; 2: cepa de referência *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC 30461); 3: UnB11 (solo); 4: UnB13 (solo); 5: UnB3 (piscina); 6: IP1S1 (piscina); 7: P3 (piscina); 8: P4 (piscina); 9: P6 (piscina); 10: P7 (piscina); 11: P9 (piscina); 12: A1 (espelho d'água); 13: A3 (espelho d'água); 14: A4 (espelho d'água); 15: A6 (espelho d'água); 16: A8 (espelho d'água); 17: A9 (espelho d'água); 18: A10 (espelho d'água); 19: A13 (espelho d'água); 20: A16 (espelho d'água); 21: CorSP (ceratite). .... 56
- Figura 5.** Cortes histológicos do cérebro dos animais inoculados pela via intracerebral. **A.** Trofozoíto (seta) do isolado de solo UnB11. **B.** Cistos (setas) do isolado de piscina IP1S1. **C e D.** Trofozoítos

	(seta) do isolado de ceratite CorSP, com vacúolo (*) evidente. Microscópio óptico; aumento: 1000x; escala = 10 µm. ....	60
<b>Figura 6.</b>	Trofozoítos (setas) com vacúolo (cabeça de seta) do isolado de ceratite (CorSP) observados em cortes histológicos de órgãos dos animais inoculados pela via intraperitoneal. <b>A.</b> Cérebro. <b>B.</b> Baço. <b>C.</b> Fígado. <b>D.</b> Pulmão. Microscópio óptico; aumento: 1000x; escala = 10 µm. ....	61
<b>Figura 7.</b>	Trofozoítos observados em cortes histológicos de órgãos dos animais inoculados pela via intraperitoneal. <b>A.</b> Trofozoítos (seta) do isolado CorSP, no pulmão. <b>B.</b> Cisto do isolado CorSP com parede enrugada (seta), no cérebro. <b>C.</b> Trofozoíto da cepa de referência <i>Acanthamoeba polyphaga</i> (ATCC 30461), no cérebro. Microscópio óptico; aumento: 1000x; escala = 10 µm. ....	62
<b>Figura 8.</b>	Percentual de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> ( $10^5$ /mL), fungos leveduriformes ( $2,8 \times 10^6$ /mL) e bactérias ( $12,8 \times 10^6$ /mL) recuperados no lavado peritoneal dos camundongos (n = 6) a diferentes intervalos de tempo. ....	63
<b>Figura 9.</b>	Percentual de amebas do isolado UnB13 ( $16 \times 10^4$ /mL) e bactérias ( $24 \times 10^6$ /mL) recuperadas no lavado peritoneal dos camundongos (n = 6) a diferentes intervalos de tempo. ....	65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Morfometria e caracterizações genotípica e fisiológica de 18 isolados ambientais de Brasília, DF, de um isolado de córnea e da cepa de referência ATCC 30461. ....	53
<b>Tabela 2.</b> Classificação dos isolados inoculados (70). ....	58
<b>Tabela 3.</b> Isolados inoculados pela via intracerebral e recuperados por histopatologia e cultura nos animais inoculados. ....	59
<b>Tabela 4.</b> Isolados inoculados pela via intraperitoneal e animais com histopatologia e cultura positivas nos órgãos recuperados. ....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- rDNA** Ácido desoxirribonucleico ribossômico
- SSU rRNA** Ácido ribonucleico ribossomal da subunidade menor
- BHE** Barreira hematoencefálica
- CEUA** Comitê de Ética de Uso Animal
- EAG** Encefalite amebiana granulomatosa
- YAS** Meio de cultura extrato de levedura (*yeast extract-Page's amoeba saline*)
- PYG** Meio de cultura proteose peptona-extrato de levedura-glucose (*peptone-yeast extract-glucose*)
- PPG** Meio de cultura proteose peptona-glucose (*proteose peptone glucose*)
- MAP** Meningoencefalite amebiana primária
- PCR** *Polymerase chain reaction*
- SNC** Sistema nervoso central
- UV** Ultravioleta
- UnB** Universidade de Brasília
- UFG** Universidade Federal de Goiás
- IC** Via intracerebral
- IN** Via intranasal
- IP** Via intraperitoneal

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>g</b>	Gramma
<b>g</b>	Gravidade
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>h</b>	Hora
<b>kb</b>	Kilobase
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µm</b>	Micrômetro
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>Mm</b>	Milimol
<b>min</b>	Minuto
<b>M</b>	Mol
<b>x</b>	Multiplicação
<b>ng</b>	Nanograma
<b>pb</b>	Par de bases
<b>%</b>	Porcentagem
<b>U</b>	Unidade
<b>x</b>	Vezez

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1 AMEBAS DE VIDA LIVRE .....	18
1.2 GÊNERO <i>ACANTHAMOEBA</i> .....	19
<b>1.2.1 Morfologia</b> .....	19
<b>1.2.2 Classificação e identificação</b> .....	19
<b>1.2.3 Patogenia</b> .....	21
1.3 ISOLAMENTO AMBIENTAL .....	24
1.4 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL PATOGÊNICO .....	25
1.5 TESTES DE PATOGENICIDADE <i>IN VITRO</i> .....	26
1.6 TESTES DE PATOGENICIDADE <i>IN VIVO</i> .....	28
1.7 <i>Acanthamoeba polyphaga</i> .....	30
1.8 PURIFICAÇÃO DE CULTURAS CONTAMINADAS <i>IN VIVO</i> .....	30
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	32
2.1 OBJETIVO GERAL .....	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	33
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
4.1 ORIGEM DOS ISOLADOS .....	35
<b>4.1.1 Amostras de solo</b> .....	35
4.1.1.1 Coleta .....	35
4.1.1.2 Semeadura .....	36
<b>4.1.2 Amostras de piscinas</b> .....	36
4.1.2.1 Coleta .....	36
4.1.2.2 Exame direto .....	37
4.1.2.3 Semeadura .....	37
<b>4.1.3 Amostras de espelhos d'água</b> .....	38
4.1.3.1 Coleta .....	38
4.1.3.2 Exame direto .....	38
4.1.3.3 Semeadura .....	39
<b>4.1.4 Amostra de material biológico humano</b> .....	39
<b>4.1.5 Cepa de referência patogênica <i>Acanthamoeba polyphaga</i></b> .....	39

4.2 INOCULAÇÃO DOS ISOLADOS EM MEIOS LÍQUIDOS .....	40
4.3 CLONAGEM DOS ISOLADOS .....	41
4.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA .....	41
4.5 AXENIZAÇÃO DOS ISOLADOS .....	42
4.6 PCR E SEQUENCIAMENTO .....	42
4.7 TESTES DE PATOGENICIDADE <i>IN VITRO</i> .....	43
<b>4.7.1 Teste de osmotolerância .....</b>	<b>43</b>
<b>4.7.2 Teste de termotolerância .....</b>	<b>44</b>
<b>4.7.3 Análise estatística .....</b>	<b>45</b>
4.8 TESTES DE PATOGENICIDADE <i>IN VIVO</i> .....	45
<b>4.8.1 Animais .....</b>	<b>45</b>
<b>4.8.2 Amebas .....</b>	<b>46</b>
<b>4.8.3 Procedimento .....</b>	<b>46</b>
<b>4.8.4 Histopatologia .....</b>	<b>47</b>
<b>4.8.5 Cultura .....</b>	<b>47</b>
<b>4.8.6 Critérios de avaliação da patogenicidade .....</b>	<b>48</b>
<b>4.8.7 Análise estatística .....</b>	<b>48</b>
4.9 TENTATIVA DE PURIFICAÇÃO <i>IN VIVO</i> DE ISOLADOS CONTAMINADOS .....	48
<b>4.9.1 Animais .....</b>	<b>49</b>
<b>4.9.2 Amebas .....</b>	<b>49</b>
<b>4.9.3 Procedimento .....</b>	<b>50</b>
<b>4.9.4 Análise estatística .....</b>	<b>50</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
5.1 ISOLADOS .....	52
5.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA .....	52
5.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR .....	55
5.4 OSMOTOLERÂNCIA .....	56
5.5 TERMOTOLERÂNCIA .....	57
5.6 TESTES DE PATOGENICIDADE <i>IN VIVO</i> .....	58
<b>5.6.1 Infecção experimental por inoculação intracerebral de trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> spp. em camundongos isogênicos .....</b>	<b>59</b>

<b>5.6.2 Infecção experimental por inoculação intraperitoneal de trofozoítos de <i>Acanthamoeba</i> spp. em camundongos isogênicos</b> .....	60
<b>5.7 TENTATIVA DE PURIFICAÇÃO <i>IN VIVO</i> DE CULTURAS CONTAMINADAS</b> .....	62
<b>5.7.1 Tentativa de purificação <i>in vivo</i> de uma cultura de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> (ATCC 30461)</b> .....	62
<b>5.7.2 Tentativa de purificação <i>in vivo</i> de uma cultura do isolado de solo UnB13</b> .....	64
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	66
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	74
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	75
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	76
<b>ANEXOS</b> .....	87
<b>ANEXO 1 – Documento de Aprovação pelo Comitê de Ética</b> .....	88
<b>ANEXO 2 – Aceite do artigo para publicação no periódico <i>Experimental Parasitology</i></b> .....	89
<b>APÊNDICE</b> .....	90
<b>APÊNDICE 1 – Artigo aceito para publicação no periódico <i>Experimental Parasitology</i></b> .....	91

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 AMEBAS DE VIDA LIVRE

As amebas de vida livre são protozoários unicelulares anfitriões amplamente distribuídos em diversos habitats, como solo, água doce, água do mar e ar atmosférico (1, 2, 3). Os gêneros das amebas que causam doenças em humanos são *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* e *Sappinia*. O gênero *Naegleria* é o agente etiológico da meningoencefalite amebiana primária (MAP) em humanos imunocompetentes que tiveram contato prévio com coleções de água. Já o gênero *Acanthamoeba* acomete indivíduos imunocomprometidos causando encefalite amebiana granulomatosa (EAG) e lesões de pele e ceratite naqueles que apresentam microtrauma na córnea. Os gêneros *Balamuthia* e *Sappinia* podem acometer tanto indivíduos imunocompetentes como imunocomprometidos e causar encefalite (4, 5). As amebas apresentam ampla distribuição geográfica, com registros de isolamento em todos os continentes. Os gêneros com maior número de relatos em amostras ambientais são *Acanthamoeba* e *Naegleria* (6, 7).

As amebas de vida livre foram classificadas por um sistema criado pela Sociedade Internacional de Protistologistas em que os eucariotos são classificados em seis grupos ou “supergrupos”, chamados de Amebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromoalveolata e Excavata. *Acanthamoeba* e *Balamuthia* foram incluídas no grupo Amebozoa (subdivisão: Acanthamoebidae). *Sappinia* também foi incluída no grupo Amebozoa (subdivisão: Thecamebidae) e *Naegleria fowleri*, no grupo Excavata (Heterolobosia – subdivisão: Vahlkampfiidae) (8).

## 1.2 GÊNERO ACANTHAMOEBA

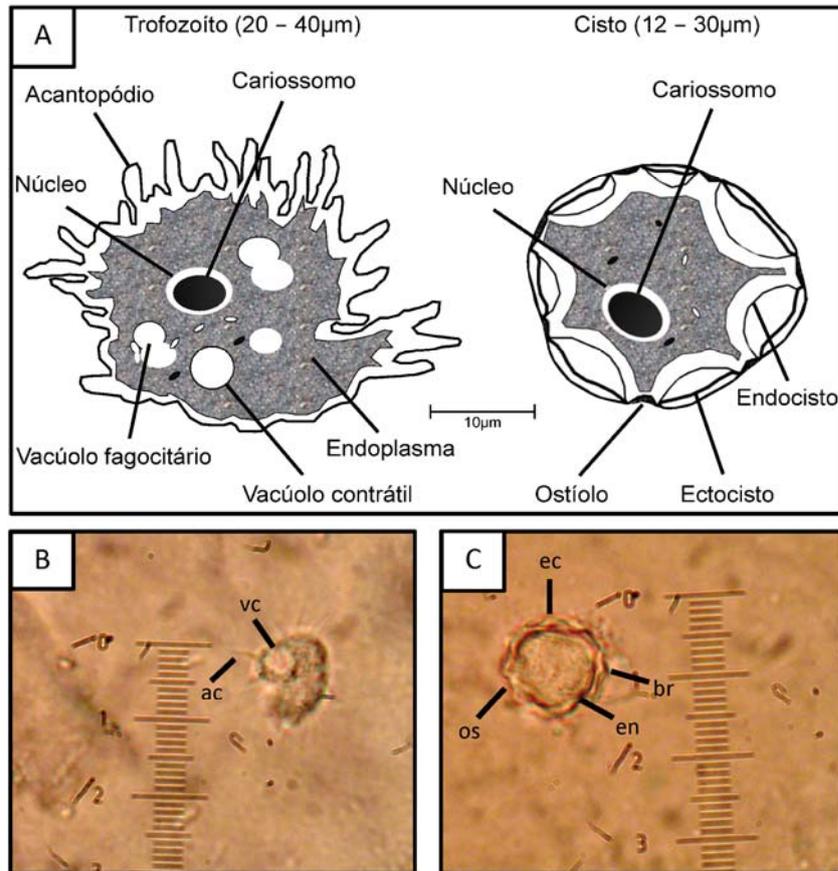
### 1.2.1 Morfologia

O gênero *Acanthamoeba* possui dois estágios em seu ciclo biológico: o trofozoíto e o cisto. O trofozoíto apresenta morfologia característica, com pseudópodes do tipo acantopódio e núcleo com nucléolo centralizado. O cisto possui dupla parede, sendo muito resistente a condições adversas de temperatura e pH e, inclusive, à desinfecção. Por ser resistente, após isolado, pode ser mantido em cultura em laboratório (Figura 1) (9, 10, 11).

### 1.2.2 Classificação e identificação

Várias espécies de *Acanthamoeba* estão associadas a infecções em seres humanos, as quais são: *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. healyi*, *A. lugdunensis*, *A. polyphaga*, *A. quina* e *A. rhyodes* (4, 5).

As espécies do gênero *Acanthamoeba* podem ser classificadas em três grupos, de acordo com o tamanho e a morfologia dos cistos (12). O grupo I possui quatro espécies: *A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata* e *A. tubiashi*. O grupo II inclui 11 espécies, que são as mais distribuídas no ambiente e frequentemente relatadas em estudos de isolamento: *A. castellanii*, *A. divionensis*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. lugdunensis*, *A. mauritaniensis*, *A. paradivionensis*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhyodes* e *A. triangularis*. O grupo III possui cinco espécies: *A. culbertsoni*, *A. lenticulata*, *A. palestinensis*, *A. pustulosa* e *A. royreba*. As espécies *A. tubiashi* e *A. hatchetti* não faziam parte da classificação inicialmente proposta (12), tendo sido posteriormente acrescentadas (13) aos grupos I e II, respectivamente (3).



**Figura 1** – **A.** Esquema das formas de desenvolvimento do gênero *Acanthamoeba* (14); **B.** Trofozoíto de *Acanthamoeba* entre lâmina e lamínula; (ac): acantopódios (pseudópodes na forma de espinhos); (vc): vacúolo contrátil. Microscópio óptico; aumento: 1000x; cada unidade equivale a 1 µm (15); **C.** Cisto de *Acanthamoeba* entre lâmina e lamínula; (ec): ectocisto (parede externa do cisto); (en): endocisto (parede interna do cisto); (br): braço (prolongamento do endocisto); (os) ostíolo. Microscópio óptico; aumento: 1000x (15).

Na atualidade, a confirmação do gênero *Acanthamoeba* e a genotipagem são realizadas por PCR. Isolados ambientais e clínicos, identificados de acordo com critérios morfológicos, podem ser confirmados por essa técnica. Iniciadores denominados ACARNA, específicos para a identificação do gênero *Acanthamoeba*, são utilizados em associação com parâmetros físicos de patogenicidade (16). A especificidade para a confirmação e a diferenciação do gênero *Acanthamoeba*, em comparação com outros gêneros de amebas, é obtida com a utilização dos iniciadores JDP1 e JDP2, que amplificam fragmentos de aproximadamente 400 pb

(17). No Irã, 14 de 19 isolados provenientes de amostras de água caracterizados morfologicamente foram confirmados com o uso da técnica de PCR empregando os iniciadores JDP1 e JDP2, específicos para o gênero *Acanthamoeba* (18).

O gênero *Acanthamoeba* possui espécies/isolados patogênicos e não patogênicos, recentemente divididos em 17 genótipos diferentes (T1 a T17), os quais foram classificados com o auxílio das análises de sequência do ácido desoxirribonucleico ribossômico (rDNA) e da subunidade menor de ácido ribonucleico ribossomal (SSU rRNA), com base em avanços tecnológicos da biologia molecular (19, 20, 21, 22, 23). No Brasil, foram classificados sete isolados ambientais do grupo I e pertencentes aos genótipos T9 e T17, utilizando-se a análise filogenética das sequências do fragmento SSU rRNA (23).

Vários isolados de *Acanthamoeba* provenientes de pacientes com ceratite foram classificados nos subtipos T3, T4, T6 e T11 (20, 24, 25, 26), sendo mais de 95% deles pertencentes ao genótipo T4, que é o mais prevalente no ambiente, sugerindo que seu potencial patogênico esteja diretamente ligado às características genotípicas (20, 24, 26).

### 1.2.3 Patogenia

A ceratite, uma das manifestações clínicas da infecção por *Acanthamoeba*, inicia-se por exposição direta da córnea à água contaminada, especialmente por usuários de lentes de contato de uso prolongado, sobretudo aqueles que utilizam piscinas e/ou mantêm práticas inadequadas de higiene das lentes, tais como emprego de água da torneira e solução salina caseira. Os principais sintomas clínicos são dor ocular intensa (em decorrência de neurite radial), hiperemia conjuntival e fotofobia. O diagnóstico deve ser precoce e o tratamento precisa ser instituído de forma agressiva para evitar a progressão da doença, que se caracteriza por infiltração estromal e ulcerações na córnea (3, 10).

Estudos realizados com isolados clínicos de *A. polyphaga* e *A. castellanii* demonstraram que a adesão desses protozoários às células da córnea se faz por intermédio de partículas de carboidratos (4). Observou-se que, na instalação da doença, há secreção de múltiplas proteases por trofozoítos de *A. polyphaga* coincubados com células epiteliais da córnea, incluindo serina peptidases, cisteína peptidases e metalopeptidases, capazes de degradar colágeno do tipo I, principal componente do estroma da córnea (27).

Como regra, a adesão celular, processo mediado por receptores, é uma propriedade chave que permite a colonização, a permanência e o início da infecção por micro-organismos em geral, sendo pré-requisito no caso das infecções por *Acanthamoeba*. Esse protozoário utiliza a adesão celular tanto como ponto de partida para invadir os tecidos (camadas mais profundas da córnea) como para evitar sua remoção pelos mecanismos de defesa iniciais (10).

Foi demonstrado que a adesão da *Acanthamoeba* a resíduos de manose promove aumento na secreção de proteases, que são determinantes fundamentais para o dano celular (28).

Acredita-se que a adesão da *Acanthamoeba* à manose promova vários processos secundários, como fagocitose e secreção de proteases, que podem desempenhar papel fundamental na fisiopatogênese das infecções, sugerindo que este processo desencadeie transdução de sinal intracelular (3, 29). Entretanto, ainda não se sabe se o mecanismo envolvido é a transcrição ou a tradução de proteases ou simplesmente a regulação da secreção propriamente dita.

Foi constatado que o uso de fluoreto de fenilmetilsulfonil, um inibidor de proteases, aboliu a citotoxicidade da *Acanthamoeba* a células do epitélio da córnea, sugerindo claramente o papel destas enzimas na patogenicidade deste micro-organismo (28). De forma semelhante, observou-se que as proteases estimulam a apoptose celular e que as cepas patogênicas de *Acanthamoeba* possuem níveis mais elevados desta classe de enzimas do que as não patogênicas (29).

Em estudos adicionais, descobriu-se que as células epiteliais da córnea humana produzem receptores para proteases ligados à proteína G e medeiam a resposta celular em vários processos, como injúria tecidual, inflamação e infecção. Esses receptores são ativados por meio da clivagem pelas proteases, que expõe o

domínio de ligação. Até a presente data, já foram identificados quatro membros da família desses receptores, denominados PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4 (3).

A *Acanthamoeba* também pode causar EAG, que geralmente é fatal. As vias de entrada desse micro-organismo no sistema nervoso central (SNC) incluem, inicialmente, o acesso às vias respiratórias, ganhando a corrente sanguínea através dos capilares alveolares e, por fim, ocorrendo a disseminação hematogênica. Tendo atingido o SNC, por serem patógenos extracelulares, as amebas precisam atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e, provavelmente, o fazem pela ruptura das junções oclusivas do endotélio vascular e/ou promovendo dano direto à célula endotelial, o que pode levar à injúria da BHE. Outros fatores que devem ser considerados são a adesão das amebas às glicoproteínas do hospedeiro, por intermédio da proteína de ligação à manose, e a produção de proteases, enzimas que determinam a quebra da integridade do endotélio vascular com degradação da ocludina e zonas ocludentes-1, resultando em aumento da permeabilidade da BHE (30). As proteases são utilizadas por vários protozoários patogênicos, além daqueles do gênero *Acanthamoeba*, tais como *Entamoeba*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Trichomonas* e *Trypanosoma* (3).

O quadro clínico de encefalite pode durar vários meses, sendo caracterizado por rigidez nuchal, cefaleia, febre, náuseas e convulsões, comprometendo pacientes imunossuprimidos (9).

A lectina também desempenha papel importante na adesão da *Acanthamoeba* às células da córnea. Em estudos recentes, verificou-se que, além da lectina, a adesão desse protozoário às células endoteliais da microcirculação encefálica em humanos é mediada por proteínas ligadas à manose, levando ao processo patogênico que desencadeia a encefalite amebiana. Isso também ocorre em outros parasitos, como a *Entamoeba histolytica*, e promove adesão e lise celular por meio de proteínas ligadas à galactose (3).

A *Acanthamoeba* também pode induzir alterações no ciclo celular na córnea e no endotélio microvascular encefálico de humanos, inibindo a expressão gênica de ciclinas (F, G1) e de cinase 6, proteínas fundamentais para a progressão do ciclo celular, promovendo suprarregulação de genes associados à interrupção do ciclo celular (GADD45A e p130 Rb) no nível da transcrição (31).

Em adição a isso, a *Acanthamoeba* produz fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA) do hospedeiro, condensação da cromatina e vacuolização da membrana celular, estando todos estes processos envolvidos na apoptose celular. Porém, ainda não está estabelecido se a interrupção no ciclo celular (que leva à apoptose) e a fagocitose possuem papéis independentes na patogênese ou se a apoptose é um processo primário estimulado pela adesão do parasito ao hospedeiro, desencadeando eventos secundários como a fagocitose (32).

Outro processo utilizado pela *Acanthamoeba* na patogenicidade envolve glicoproteínas da membrana conhecidas como ecto-ATPases, que possuem sítios ativos no microambiente celular externo, podendo estar implicadas na interação entre o parasito e o hospedeiro. Acredita-se que as ecto-ATPases dos protozoários estão relacionadas à patogênese, pois se encontram implicadas em alguns processos, como: proteção contra os efeitos citolíticos do ATP, adesão celular, regulação da concentração dos substratos de ecto-cinase, finalização da sinalização purinérgica e transdução de sinal. Vale ressaltar, ainda, que a adesão mediada por lectina pode estar associada às atividades provenientes das ecto-ATPases, sendo necessários mais estudos para identificar de forma mais detalhada esta relação, bem como sua associação com a proteína ligada à manose, o que poderá identificar possíveis alvos terapêuticos para combater a doença (3).

A patogenicidade da *Acanthamoeba* também é facilitada por enzimas proteolíticas (ou proteases), um grupo de enzimas catalizadoras da degradação de pontes peptídicas, diretamente envolvidas na invasão celular e no dano tecidual.

Com o uso da microscopia eletrônica de transmissão, ficou demonstrado que a patogenicidade do gênero *Acanthamoeba* não é aumentada pela presença de bactérias endossimbiontes (33).

### 1.3 ISOLAMENTO AMBIENTAL

Há relatos de isolamento de amebas de vida livre em diversos ambientes no mundo todo, tais como no ar (34, 35), no solo (36), na água (18, 37, 38, 39) e em

ambientes hospitalares (40, 41). No Brasil, os relatos de isolamentos dessas amebas tem aumentado nos últimos anos. Portanto, em nosso país, as amebas de vida livre já foram isoladas de habitats como água (15, 42, 43, 44), solo (15), areia (45) e poeira de hospitais (7, 46, 47).

Desde o ano de 2005, o Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da Universidade de Brasília (UnB) vem realizando trabalhos de isolamento de amebas de vida livre dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria* em amostras ambientais em Brasília, DF (15).

Os isolados pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* foram caracterizados morfológicamente e integram a coleção biológica do referido laboratório. Apenas esse gênero foi escolhido para o acervo em decorrência da disponibilidade das condições exigidas para o seu cultivo e manutenção. As amostras foram mantidas para as caracterizações biológica, molecular e do seu potencial patogênico, procedimentos realizados no presente trabalho.

#### 1.4 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL PATOGÊNICO

A determinação do potencial patogênico de isolados ambientais com o uso de modelos experimentais e de técnicas bioquímicas, bem como sua identificação genotípica com o emprego de técnicas moleculares são de extrema importância no campo da saúde pública. No mundo todo, estudos sobre a determinação do potencial patogênico e o emprego de tecnologias de biologia molecular para a identificação de amostras ambientais têm obtido muito sucesso, especialmente no que concerne ao gênero *Acanthamoeba* (16, 24, 25, 39, 48, 49).

O potencial patogênico desses protozoários tem sido alvo de muitos estudos *in vitro* com diversas culturas, incluindo fibroblastos, células epiteliais da córnea, células endoteliais e neurais (50).

Não obstante a importância crescente das infecções causadas por *Acanthamoeba* e de suas consequências devastadoras, os principais mecanismos

associados à sua patogenicidade ainda são pouco conhecidos. Assim sendo, faz-se necessário compreender adequadamente os processos moleculares envolvidos na patogenicidade a fim de estabelecer intervenções terapêuticas. Por outro lado, já está bem sedimentado o conceito de que a patogenicidade é um mecanismo complexo e multifatorial que depende tanto do parasito quanto do hospedeiro, não havendo um determinante principal que cause ou facilite o processo patogênico das infecções por *Acanthamoeba* em humanos (3).

Diversos são os fatores diretos e indiretos de patogenicidade do gênero *Acanthamoeba* descritos na literatura (51). Entre os fatores diretos, estão os mecanismos dependentes do contato, como a adesão às células do hospedeiro e a fagocitose destas células pelos trofozoítos. O fator independente do contato é a produção de proteases extracelulares. Entre os fatores indiretos de patogenicidade, estão o crescimento em alta osmolaridade e em altas temperaturas, o crescimento em diferentes faixas de pH, a resistência a drogas, a ubiquidade e os fatores ligados ao hospedeiro.

Na década de 1970, foram descritos critérios morfológicos em chaves para a identificação de amebas de vida livre (1) e, logo após, foram acrescentados os grupos de classificação (12). Já no século XXI, demonstrou-se a formação de amebostomas como característica de patogenicidade e o número e a morfologia de acantopódios (pseudópodes em forma de espinhos) de uma mesma cepa de referência proveniente de um isolado clínico e de um isolado ambiental puderam ser comparados com o uso de microscopia eletrônica de varredura (52). Atualmente, as análises de sequências são utilizadas para a sua identificação (21).

## 1.5 TESTES DE PATOGENICIDADE *IN VITRO*

A avaliação do efeito citopático de isolados de *Acanthamoeba* em culturas de células intactas também é utilizada como característica de patogenicidade. O papel da adesão dependente de carboidratos nos mecanismos citopáticos de uma cepa de

referência (*A. castelani*), causadora de ceratite, já foi demonstrado (53). Também o efeito citopático de isolados ambientais em comparação com cepas patogênicas de referência coincubadas por 24 h em monocamadas de células epiteliais e fibroblastos foi comprovado por diversos autores (16, 24, 39, 52, 54, 55).

A interação entre trofozoítos de *Acanthamoeba* e células de mamíferos pode ser observada com o uso de microscopia eletrônica. A indução da apoptose *in vitro* de células do SNC por trofozoítos de *A. castelani* e *A. polyphaga* (56), assim como a inibição da quimiotaxia de macrófagos a trofozoítos de *Acanthamoeba* utilizando-se um derivado canabinoide em ensaio *in vitro* (57) foram evidenciadas por microscopia eletrônica de varredura.

A detecção da superexpressão da protease 107-KDa em culturas de células coincubadas com isolados patogênicos também foi descrita como uma ferramenta de diagnóstico diferencial (54). A secreção de enzimas proteolíticas, aliada aos resultados de ensaios de osmotolerância e termotolerância, também tem sido utilizada para a avaliação do potencial patogênico (49).

Os ensaios para a detecção de proteases geralmente demandam muito tempo. Por esse motivo, foi desenvolvido um método sensível, com base na técnica de PCR e em experimentos simples capazes de diferenciar isolados patogênicos de não patogênicos (16). Para a realização de PCR, foram utilizados dois protocolos de extração de DNA. Além da técnica de PCR, foi demonstrado o efeito citopático em culturas de células de coelho imortalizadas utilizando-se a osmotolerância e a termotolerância como parâmetros físicos de diferenciação (16).

As amebas do gênero *Acanthamoeba* são expostas a condições de alta osmolaridade durante o contato com o filme lacrimal (em decorrência da salinidade da lágrima) e a superfície epitelial da córnea. A fim de se estabelecer de maneira eficaz, o parasito deve resistir às condições adversas do ambiente para apresentar adequado crescimento. O desenvolvimento em altas temperaturas e osmolaridades é uma das peculiaridades das cepas patogênicas de *Acanthamoeba* (16, 24, 25, 48). No entanto, os mecanismos pelos quais as amebas se adaptam a altas temperaturas e conseguem manter suas atividades metabólicas ainda são pouco conhecidos (3).

A osmotolerância consiste na inoculação de trofozoítos de *Acanthamoeba* em meio de cultura ágar não nutriente acrescido de manitol em diversas molaridades. A

alta osmolaridade interfere no crescimento de amebas não patogênicas, mas as cepas patogênicas podem crescer em presença de diversas concentrações de manitol (16). Esse parâmetro de patogenicidade tem sido utilizado por pesquisadores em todo o mundo (24, 58, 59, 60, 61).

As características de crescimento, o efeito citopático e a patogenicidade em animais de 36 isolados de amebas de vida livre foram avaliados na Bélgica (48). No que se refere à termotolerância, no gênero *Acanthamoeba* houve relação entre o crescimento a 40°C e a patogenicidade nas espécies *A. culberstoni*, *A. hatchetti*, *A. royreba* e *A. lenticulata*. Em outro estudo, houve crescimento em temperaturas entre 37°C e 42°C das seguintes espécies de cepas de referência: *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. palestinensis* e *A. astronyxis* (16). Também foi demonstrada a patogenicidade com o crescimento de isolados ambientais a 37°C (24, 46, 47, 61).

## 1.6 TESTES DE PATOGENICIDADE *IN VIVO*

Os fatores de patogenicidade também podem ser testados *in vivo*. Na ceratite causada por *Acanthamoeba*, ensaios *in vitro* com culturas de células da córnea indicaram que a extensão da ligação dos trofozoítos a estas células está intimamente relacionada com a suscetibilidade de cada mamífero, sendo esta ligação mais extensa em três espécies: homem, hamster e porco (10). O porco é considerado como o melhor modelo para a demonstração da ceratite devido à semelhança do tamanho de sua córnea com a humana (62). Entretanto, têm sido obtidos bons resultados ao demonstrar a ceratite em hamsters com o posterior exame histopatológico (63). Em alguns estudos, foi descrita a utilização de lentes de contato previamente infectadas com *A. castellanii* em hamsters com córneas intactas (64, 65).

A infecção experimental é amplamente utilizada para a demonstração da patogenicidade dos isolados ambientais de *Acanthamoeba*, sendo utilizados

modelos com camundongos, hamsters, porcos e, mais recentemente, gafanhotos (10).

O desenvolvimento de EAG em camundongos imunossuprimidos foi obtido com inoculação de culturas axênicas, seguindo-se a observação dos sinais clínicos e a tentativa de reisolamento de formas de desenvolvimento no tecido cerebral. As amebas do gênero *Acanthamoeba* são solúveis na bile e, por esta razão, não causam infecção caso sejam ingeridas (66). No entanto, possuem a capacidade de penetrar a mucosa e determinar danos repetidos a vários órgãos, quebrando barreiras naturais, o que torna a via nasal uma das mais infectantes. De fato, essas amebas podem se multiplicar na cavidade nasal, potencializando a virulência de um pequeno inóculo antes da invasão do SNC. Comprovou-se a virulência de 36 isolados com a associação do efeito citopático e da infecção experimental pela via intracerebral (IC) seguida da via intranasal (IN) (48). As características da infecção de camundongos por *Acanthamoeba*, como período de incubação, quadro clínico, disseminação no SNC, órgãos afetados, resposta do hospedeiro e formas reisoladas no tecido cerebral já foram descritas na literatura (2).

Na Coreia, a EAG foi induzida em camundongos com a injeção intracraniana de trofozoítos (67). Em spas termais da Espanha, constatou-se a capacidade de desenvolvimento a 37°C de amebas de vida livre isoladas com inoculação pela IC e pela IN em camundongos (68). Na Polônia, isolados provenientes de piscinas foram inoculados em camundongos pela IN (69). No México, foram definidos critérios de patogenicidade, não patogenicidade e invasividade com a inoculação pela IN de isolados de fontes de água em camundongos de 3 semanas de idade (70). Na Suíça, comprovou-se a patogenicidade de isolados provenientes de quatro resorts de águas termais com a inoculação pela IN em camundongos com 6 semanas de idade (39).

### 1.7 *Acanthamoeba polyphaga*

O uso de uma cepa de referência para avaliar critérios de patogenicidade como controle é de extrema importância para a caracterização de isolados. O isolamento de *A. polyphaga* foi feito pela primeira vez no estado do Texas, nos Estados Unidos, a partir de um paciente com ceratite (71) e, por ser comprovadamente patogênica, esta foi escolhida como cepa de referência. Embora *A. polyphaga* pertença ao complexo *A. castellanii*, em testes de interação com células epiteliais da córnea de hamsters, seus trofozoítos apresentaram maior número de acantopódios (72). Algumas cepas de *A. polyphaga* também são capazes de destruir células epiteliais da córnea após 12 h em cultura, bem como osteoblastos humanos (50, 51). Anticorpos monoclonais e citometria de fluxo já foram utilizados para diferenciar essa espécie de outras amebas de vida livre (73). *A. polyphaga* também pode ser identificada com a análise do DNA mitocondrial, pois apresenta particularidades em pequenas subunidades do gene do rRNA (74, 75).

### 1.8 PURIFICAÇÃO DE CULTURAS CONTAMINADAS *IN VIVO*

Sabe-se que, por ser tecido associado à cavidade e aos órgãos abdominais, o peritônio concentra grande população de macrófagos (76), os quais pertencem ao sistema mononuclear fagocitário e são as principais células da imunidade inata, especializadas na endocitose de micro-organismos (77), inclusive de amebas. Em ensaios *in vitro*, comprovou-se que macrófagos oriundos de ratos, previamente sensibilizados ou não, são capazes de endocitar e lisar amebas, mas também podem ser lisados pelos trofozoítos destas, sobretudo os não sensibilizados (78). Também foi possível concluir que, enquanto os trofozoítos de *A. polyphaga* e *A. castellanii* foram fracamente suscetíveis aos macrófagos ativados de camundongos,

os de *A. culbertsoni*, espécie com alta patogenicidade, foram capazes de escapar dos mecanismos efetores destes macrófagos (79).

Considerando que a presença de micro-organismos na cavidade abdominal estimula não somente a atividade fagocitária dos macrófagos residentes, mas também a diapedese de monócitos/macrófagos para auxiliar o processo de eliminação dos agentes infecciosos e considerando os possíveis mecanismos de escape das amebas, a utilização do peritônio de camundongos não sensibilizados para purificar cultivos de *Acanthamoeba* contaminados com diferentes micro-organismos pode ser válida.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o potencial patogênico de isolados do gênero *Acanthamoeba* pertencentes à coleção biológica do Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da UnB e avaliar uma técnica de purificação.

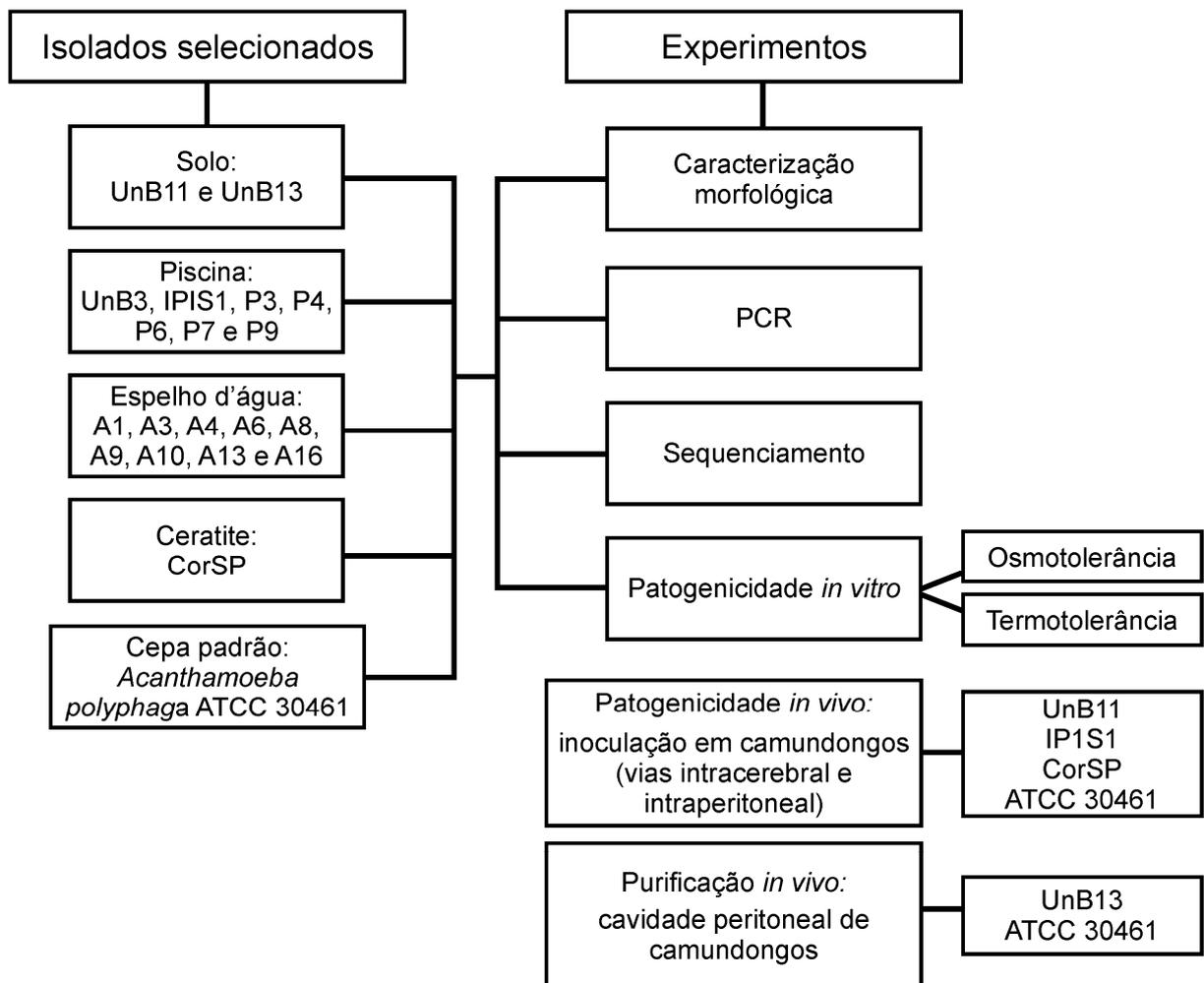
### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar os isolados do gênero *Acanthamoeba* para os experimentos de demonstração do potencial patogênico.
- Utilizar a cepa de referência *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC 30461) como controle positivo.
- Genotipar os isolados do Gênero *Acanthamoeba*.
- Inferir o potencial patogênico dos isolados do gênero *Acanthamoeba* com a utilização de parâmetros físicos de patogenicidade, como osmotolerância e termotolerância.
- Avaliar o potencial patogênico por meio da infecção experimental em camundongos inoculados pelas vias intracerebral e intraperitoneal de trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. de diferentes isolados.
- Avaliar a utilização do peritônio de camundongos não sensibilizados para purificar cultivos de *Acanthamoeba polyphaga* e de um isolado de solo contaminados com diferentes micro-organismos.

### 3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a consecução deste estudo, foram selecionados 18 isolados ambientais e um isolado proveniente de ceratite com características morfológicas semelhantes às do gênero *Acanthamoeba*. A cepa de referência *A. polyphaga* ATCC 30461 foi utilizada como controle.

Na Figura 2, apresenta-se um organograma abarcando todos os experimentos realizados com os isolados selecionados para a avaliação de seu potencial patogênico.



**Figura 2** – Organograma dos experimentos realizados com os isolados selecionados para a avaliação do potencial patogênico.

Os isolados foram submetidos a: caracterização morfológica, PCR com a utilização de iniciadores específicos para o gênero *Acanthamoeba*, sequenciamento e testes de patogenicidade *in vitro* para verificação de sua osmotolerância e termotolerância. A seguir, três isolados e a cepa de referência ATCC 30461 foram submetidos ao teste de patogenicidade *in vivo* com inoculação pela IC e pela via intraperitoneal (IP) de trofozoítos em camundongos para avaliar sua capacidade de causar EAG e de recuperação a partir dos tecidos e da cultura. Finalmente, foi realizada a purificação *in vivo* das culturas de um isolado de solo e da cepa de referência ATCC 30461 com inoculação na cavidade peritoneal de camundongos.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 ORIGEM DOS ISOLADOS**

Os isolados com características morfológicas semelhantes às do gênero *Acanthamoeba* armazenados no Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da UnB foram selecionados para o estudo. Os isolados originaram-se de amostras de solo, piscinas, espelhos d'água, provenientes da cidade de Brasília, DF (15°50'16" sul, 47°42'48" oeste, a uma altitude de 1.000 a 1.200 m) e da córnea de um paciente com ceratite, esta última cedida pela Profa. Dra. Annette Silva Foronda (Universidade de São Paulo).

#### **4.1.1 Amostras de solo**

##### **4.1.1.1 Coleta**

As amostras de solo (UnB11 e UnB13) foram coletadas diretamente de um dos jardins da UnB, em Brasília, DF. O solo foi raspado com a borda de uma lâmina de microscópio seca e esterilizada em autoclave (AV 50, Phoenix Equipamentos Científicos, Araquara, SP, Brasil).

#### 4.1.1.2 Semeadura

Após a coleta, as amostras de solo foram semeadas no centro de duas placas contendo ágar não nutriente 1,5%, coberto com suspensão de *Escherichia coli* inativada pelo calor em autoclave para alimentação das amebas, sendo uma incubada a 25°C e a outra, a 37°C. A manutenção das amostras foi realizada com subcultivos periódicos, a intervalos de 48 h, com a semeadura de um pedaço de ágar contendo trofozoítos e cistos em uma nova placa contendo ágar não nutriente 1,5% coberto com suspensão de *E. coli* inativada pelo calor (71).

#### 4.1.2 Amostras de piscinas

##### 4.1.2.1 Coleta

As amostras de piscinas foram coletadas em clube privado (UnB3), escola de natação (IP1S1) e clubes públicos (P3, P4, P6, P7 e P9). De cada piscina, foram coletados 800 mL da água da superfície em frascos de vidro estéreis e 20 *swabs* foram passados nas bordas perto da superfície da água, principalmente em lugares com presença de lodo ou de biofilme. Em seguida, os frascos foram fechados e os *swabs* foram acondicionados em tubos contendo 10 mL de solução de transporte (uma parte de solução salina estéril e três partes de água destilada estéril). Tanto os tubos quanto os frascos foram vedados com filme plástico, identificados com a data e o local da coleta e transportados em temperatura ambiente para o Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da UnB.

#### 4.1.2.2 Exame direto

As amostras foram levadas para câmara de fluxo laminar (Purifier Logic Class II, Type B2 Total Exhaust Biological Safety Cabinet, Labconco Corp., Kansas, MO, Estados Unidos) e transferidas para cálices de sedimentação, os quais foram vedados para evitar contaminação. Após 24 h, uma alíquota do sedimento dos cálices foi colocada entre lâmina e lamínula para exame direto em microscópio óptico (DMLB, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemanha), nos aumentos de 100x e 400x. Para cada amostra, foram observadas duas lâminas.

#### 4.1.2.3 Semeadura

Na câmara de fluxo laminar, 10 mL do sedimento de cada amostra foram transferidos para tubos do tipo falcon e centrifugados a 447x *g* por 15 min (centrífuga DCS 16 RV, Presvac, Buenos Aires, Argentina). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e 1 mL do sedimento de cada amostra foi dividido e colocado no centro de duas placas de cultura contendo ágar não nutriente 1,5%, coberto por suspensão de *E. coli* inativada pelo calor em autoclave para alimentação das amebas, sendo uma incubada a 25°C e a outra, a 37°C.

As placas foram observadas ao microscópio óptico invertido (TCM 400 binocular, Labomed Inc., Culver City, CA, Estados Unidos) nos aumentos de 200x e 400x, a intervalos de 24 h, durante 14 dias, quanto à presença de amebas de vida livre e suas formas de desenvolvimento.

### 4.1.3 Amostras de espelhos d'água

#### 4.1.3.1 Coleta

De cada espelho d'água, foram coletadas amostras de 200 mL de água da superfície em frascos de vidro estéreis (A1, A3, A4, A6, A8, A9, A10, A13 e A16) e 20 *swabs* foram passados nas bordas perto da superfície, principalmente em lugares com presença de lodo ou de biofilme. Em seguida, os frascos foram fechados e os *swabs* foram acondicionados em tubos contendo 10 mL de solução de transporte (uma parte de solução salina estéril e três partes de água destilada estéril). Tanto os tubos quanto os frascos foram vedados com filme plástico, identificados com a data e o local da coleta e transportados em temperatura ambiente para o Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da UnB.

#### 4.1.3.2 Exame direto

As amostras foram levadas para câmara de fluxo laminar e transferidas para cálices de sedimentação, os quais foram vedados para evitar contaminação. Após 24 h, uma alíquota do sedimento dos cálices foi colocada entre lâmina e lamínula para exame direto em microscópio óptico, nos aumentos de 100x e 400x. Para cada amostra, foram observadas duas lâminas.

#### 4.1.3.3 Semeadura

Na câmara de fluxo laminar, 10 mL do sedimento de cada amostra foram transferidos para tubos do tipo falcon e centrifugados a 447x *g* por 15 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e 1 mL do sedimento de cada amostra foi dividido e colocado no centro de duas placas de cultura contendo ágar não nutriente 1,5%, coberto com suspensão de *E. coli* inativada pelo calor em autoclave para alimentação das amebas, sendo uma incubada a 25°C e a outra, a 37°C.

As placas foram observadas ao microscópio óptico invertido nos aumentos de 200x e 400x, a intervalos de 24 h, durante 14 dias, quanto à presença de amebas de vida livre e suas formas de desenvolvimento.

#### 4.1.4 Amostra de material biológico humano

A amostra de córnea (CorSP), proveniente do raspado da córnea de um paciente do estado de São Paulo, cedida em 2005, foi mantida em cultura com repiques sucessivos em placas novas com ágar não nutriente 1,5%, coberto com suspensão de *E. coli* inativada pelo calor em autoclave para alimentação das amebas.

#### 4.1.5 Cepa de referência patogênica *Acanthamoeba polyphaga*

Uma alíquota da cepa de referência *A. polyphaga* ATCC 30461 foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Fernando Costa e Silva-Júnior, do Instituto de

Biofísica Carlos Chagas Filho (Universidade Federal do Rio de Janeiro), em uma suspensão de cistos em solução de encistamento (NaCl ou KCl – 0,1M; tris amina – 0,02M; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 0,008M; CaCl<sub>2</sub> – 0,0004M; NaHCO<sub>3</sub>–0,0001M) (80), e utilizada como controle positivo no presente estudo. A cepa foi inoculada em ágar não nutriente 1,5%, coberto com suspensão de *E. coli* inativada pelo calor em autoclave para alimentação das amebas, assim como nos seguintes meios de cultura líquidos: proteose peptona-glucose (*proteose peptone glucose* – PPG, 1,5 g de proteose peptona, 1,8 g de glucose, 100 mL de solução salina de Page), extrato de levedura (*yeast extract-Page's amoeba saline* – YAS, 0,01 g de extrato de levedura e 100 mL de solução salina de Page), proteose peptona-extrato de levedura-glucose (*peptone-yeast extract-glucose* – PYG, 0,75 g de proteose peptona, 0,75 g de extrato de levedura, 1,5 g de glucose e 100 mL de solução salina de Page), todos acrescidos de penicilina G (5.000 U/mL, Mantecorp Indústria Química e Farmacêutica Ltda. Rio de Janeiro, RJ, Brasil), estreptomicina (5 mg/mL, Wyeth Consumer, São Paulo, SP, Brasil) e anfotericina B (12,5 µg/mL, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil) (16).

#### 4.2 INOCULAÇÃO DOS ISOLADOS EM MEIOS LÍQUIDOS

As placas dos isolados foram marcadas nas regiões onde apresentavam maior quantidade de cistos e trofozoítos e levadas para câmara de fluxo laminar. Os cistos e os trofozoítos foram colhidos das placas de subcultura com 2 mL de água destilada estéril e lavados três vezes com centrifugação a 447x g por 15 min. O lavado foi recolhido em microtubos do tipo eppendorf e os trofozoítos e os cistos foram quantificados em hemocítmetro. O sedimento de cada isolado foi inoculado nos meios de cultura líquidos PPG, YAS e PYG. Os meios foram acrescidos de penicilina G (100 µg/mL) e estreptomicina (5 mg/mL) (16, 49).

Para a verificação do crescimento, os cistos e os trofozoítos foram quantificados em hemocítmetro a intervalos de 72 h. Após esse período, as

amostras foram levadas para câmara de fluxo laminar, homogeneizadas e submetidas à clonagem.

#### 4.3 CLONAGEM DOS ISOLADOS

A clonagem dos isolados consiste em repiques sucessivos de culturas positivas até a inoculação de um único trofozoíto em um novo meio de cultura para a obtenção de uma população de amebas proveniente de cada isolado selecionado (81).

Para cada amostra quantificada, foi calculado o volume para a inoculação de um único trofozoíto em meio líquido PYG acrescido de penicilina G (100 µg/mL) e estreptomicina (5 mg/mL) (16, 49). A seguinte equação foi utilizada para o cálculo: média dos quadrantes opostos  $\times 10 \times 1000$ . O resultado foi expresso em trofozoítos/mL.

Os cistos e os trofozoítos foram quantificados em hemocitômetro a intervalos de 72 h para a verificação de seu crescimento. Posteriormente, os isolados foram inoculados em tubos contendo cerca de 3 mL de solução de encistamento (80) para a caracterização morfológica.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Os cistos provenientes da solução de encistamento foram preparados para observação entre lâmina e lamínula ao microscópio óptico no aumento de 1000x.

As características morfológicas dos cistos e dos trofozoítos foram, então, analisadas (1). De cada isolado, foram medidos 100 cistos com a utilização de uma

ocular micrométrica. Os isolados foram classificados de acordo com os três grupos conhecidos (I, II e III), com base no tamanho e na forma dos cistos (3, 12, 71).

#### 4.5 AXENIZAÇÃO DOS ISOLADOS

Os tubos contendo os cistos dos clones em solução de encistamento (80) foram centrifugados a 252x *g* por 15 min e 1 mL da solução foi transferido para um microtubo do tipo eppendorf. A solução foi lavada três vezes com centrifugação a 447x *g* por 15 min. O sedimento foi transferido para um novo tubo contendo meio líquido (PPG, PYG e YAS) para a indução da transformação em trofozoítos para posterior utilização em PCR e nos experimentos de patogenicidade (16, 82).

#### 4.6 PCR E SEQUENCIAMENTO

A extração de DNA foi realizada a partir de culturas dos meios líquidos com 72 h de crescimento, contendo 10<sup>4</sup> trofozoítos, utilizando o kit DNeasy® (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos), seguindo o protocolo do fabricante.

Realizou-se PCR visando o reconhecimento específico da região 18S do rDNA do gênero *Acanthamoeba*. Os iniciadores utilizados foram: JDP1 (5'-GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA-3') e JDP2 (5'-TCTCACAAGCTGCTAGGGGAGTCA-3') (17). A reação ocorreu com volume total de 50 µL contendo 20–30 ng de DNA, 0,2 mM de dNTPs mix (Invitrogen, Eugene, OR, Estados Unidos), 0,4 mM de cada oligonucleotídeo, tampão de reação (50 mM de KCl<sub>2</sub>, 10 mM de Tris-HCl), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, Eugene, OR, Estados Unidos). A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 94°C por 1 min, 35 x de 67°C por 1 min, 72°C por 1 min e 72°C por 5 min.

O produto da amplificação (10 mL) foi separado em gel de agarose 0,8%, corado com solução 0,5 mM/mL de brometo de etídio e observado sob luz ultravioleta (UV). Posteriormente, o produto da PCR foi purificado usando o kit Illustra® GFX® PCR DNA and Gel Band (GE Healthcare). O sequenciamento dos isolados foi realizado com 1 µL do produto de PCR (60–100 ng), DYEnamic® ET Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare Illustra® GFX® PCR DNA and Gel Band Purification Kit), JDP1 e JDP2, no sequenciador automático 1000 MegaBACE (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, Estados Unidos) no Laboratório de Biologia Molecular da UnB e na Genomic Engenharia Molecular (São Paulo, SP, Brasil).

A região 18S do rDNA dos isolados foi comparada com sequências de diferentes espécies de *Acanthamoeba* publicadas (GenBank). As sequências de nucleotídeos dos isolados determinadas neste estudo estão disponíveis no GenBank sob os números de acesso JF960525 e JQ268232 a JQ268248 e JQ791107.

## 4.7 TESTES DE PATOGENICIDADE *IN VITRO*

### 4.7.1 Teste de osmotolerância

Para avaliar o efeito da osmolaridade sobre o crescimento de trofozoítos de *Acanthamoeba* de cada isolado, placas com ágar não nutriente 1,5% (controle) e com ágar não nutriente 1,5% contendo manitol (Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) nas concentrações de 0,5 M, 1,0 M e 1,5 M foram previamente cobertas com suspensão de *E. coli* viva e incubadas a 37°C durante 24 h para a formação de colônias (16).

A partir de cada isolado e da cepa de referência ATCC 30461, 1000 trofozoítos cultivados nos meios de cultura líquidos foram inoculados nas placas

acima descritas, as quais foram incubadas a 30°C durante 120 h. O experimento foi realizado em triplicata.

O diâmetro do inóculo foi medido no momento da inoculação e o tamanho das zonas claras, que indicam consumo bacteriano na superfície do ágar, foi medido após 120 h. A presença e a ausência de zonas claras em cada placa foram pontuadas como positivo (+) e negativo (-), respectivamente (61).

#### **4.7.2 Teste de termotolerância**

O crescimento dos isolados do gênero *Acanthamoeba* em condições de alta temperatura, como parâmetro de patogenicidade, foi avaliado em placas preparadas com ágar não nutriente 1,5% cobertas com suspensão de *E. coli* viva previamente incubadas a 37°C por 24 h para o crescimento das bactérias (16).

A partir de cada isolado e da cepa de referência ATCC 30461, 1000 trofozoítos cultivados nos meios líquidos foram inoculados nas placas acima descritas, as quais foram incubadas a 25°C, 30°C e 37°C durante 120 h. O experimento foi realizado em triplicata.

O diâmetro do inóculo foi medido no momento da inoculação e o tamanho das zonas claras, que indicam consumo bacteriano na superfície do ágar, foi medido após 120 h. A presença e a ausência de zonas claras em cada placa foram pontuadas como positivo (+) e negativo (-), respectivamente (61).

### 4.7.3 Análise estatística

As variações de crescimento entre os isolados em osmolaridades e temperaturas diferentes foram analisadas utilizando-se o teste H de Kruskal-Wallis (alfa = 0,01), com o software Statistica 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, Estados Unidos).

## 4.8 TESTES DE PATOGENICIDADE *IN VIVO*

Este experimento foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA), do Instituto de Ciências Biológicas da UnB, sob o número UnBDOC n° 43036/2010 (ANEXO 1).

O teste de patogenicidade *in vivo* foi realizado com a observação do desenvolvimento do quadro de EAG e recuperação das formas de desenvolvimento no tecido cerebral e nos órgãos de camundongos infectados pela IC e pela IP (48, 70).

### 4.8.1 Animais

Camundongos isogênicos saudáveis, de ambos os sexos, da raça Swiss (n = 48), com 15 dias de idade, provenientes do Biotério da UnB, uniformes quanto ao peso, foram utilizados para a realização deste estudo. Para cada isolado, foram inoculados 12 animais (6 IC e 6 IP). Os animais foram numerados de 1 a 6, de

acordo com a via de inoculação, e identificados com marcações na coxa, cabeça, rabo, costas, barriga e orelha, respectivamente.

O estudo foi conduzido no Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da UnB. Os animais foram colocados em gaiolas e submetidos às condições do laboratório pelo menos cinco dias antes do início dos experimentos. O ciclo claro/escuro foi de 12 h/12 h e água e alimento para roedores (Labina, Purina do Brasil Ltda., Paulínia, SP, Brasil) foram disponibilizados *ad libitum*.

#### **4.8.2 Amebas**

Trofozoítos de três isolados (UnB11 – solo, IP1S1 – piscina e CorSP – ceratite) e da cepa de referência ATCC 30461 com 72 h de crescimento em meio líquido e quantificados em hemocítômetro foram inoculados nos camundongos.

#### **4.8.3 Procedimento**

Os animais foram levados para câmara de fluxo laminar e anestesiados pela IP com ketamina (80 mg/kg) + xilazina (10 mg/kg). Após a anestesia, alíquotas de cada cultura contendo  $10^4$  trofozoítos foram inoculadas pela IC na sutura sagital e pela IP. A recuperação da anestesia foi observada no laboratório e, posteriormente, os animais foram levados ao alojamento de animais da Faculdade de Medicina da UnB. Para cada isolado, seis animais foram inoculados pela IC e seis pela IP.

Os camundongos foram observados durante 21 dias, diariamente, quanto a mudanças fisiológicas, como ataxia, perda de peso e morte. Ao final desse período, os camundongos foram anestesiados e sacrificados com injeção de 1 mmol/kg de cloreto de potássio. O cérebro dos animais submetidos à IC foi retirado e dividido.

Dos animais submetidos à IP, os seguintes órgãos foram retirados e divididos: cérebro, fígado, rins, baço e pulmão. Uma parte de cada órgão foi imersa em solução tamponada de formol a 10% e encaminhada ao Laboratório de Cirurgia Experimental e ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da UnB para a realização dos exames histopatológicos e outra parte foi encaminhada para a cultura.

#### **4.8.4 Histopatologia**

Os tecidos fixados foram incluídos em parafina, seccionados a 5 µm de espessura e corados com hematoxilina-eosina. As lâminas positivas foram documentadas por meio de fotografias (câmera Sony Cyber-shot®, Sony Corp., China), com a câmera acoplada ao microscópio óptico (DMLS, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemanha), no aumento de 1000 x, no Laboratório de Patologia Geral da Universidade Federal de Goiás (UFG).

#### **4.8.5 Cultura**

Os órgãos foram macerados e semeados em ágar não nutriente 1,5% coberto com suspensão de *E. coli* inativada pelo calor em autoclave para a posterior detecção de formas de *Acanthamoeba*. As placas foram vedadas com Parafilm® (Brand GMBH + CO KG, Wertheim, Alemanha) e observadas diariamente quanto à presença de cistos e/ou trofozoítos, durante 14 dias (70, 83, 84).

#### 4.8.6 Critérios de avaliação da patogenicidade

Em cada via de inoculação, os isolados foram classificados de acordo com sua patogenicidade e invasividade em: a) patogênicos: isolados que provocaram mudanças fisiológicas e/ou o óbito de pelo menos um dos seis camundongos com histopatologia e/ou cultura dos órgãos positiva; b) invasivos: isolados que não provocaram mudanças fisiológicas e/ou óbito dos animais no período estudado (21 dias), mas apresentaram histopatologia e/ou cultura positiva; c) não patogênicos: isolados que não causaram mudanças fisiológicas e/ou óbito de nenhum animal com histopatologia e/ou cultura negativa (70).

#### 4.8.7 Análise estatística

Nos testes de patogenicidade *in vivo*, diferenças nas proporções de animais positivos após a inoculação dos isolados (recuperação dos isolados) foram analisadas considerando os métodos de detecção (histopatologia e cultura) e as vias de inoculação (IC e IP), utilizando-se o teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ), com o software Statistica 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, Estados Unidos).

### 4.9 TENTATIVA DE PURIFICAÇÃO *IN VIVO* DE ISOLADOS CONTAMINADOS

Este experimento foi avaliado e aprovado pelo CEUA, do Instituto de Ciências Biológicas da UnB, sob o número UnBDOC n° 43036/2010.

Na tentativa de eliminar a contaminação por fungos e bactérias de uma placa de cultura da cepa de referência ATCC 30461 e a contaminação por bactérias de

uma placa do isolado de solo UnB13, foi realizada inoculação pela IP em camundongos e recuperação a diferentes intervalos de tempo.

#### **4.9.1 Animais**

Camundongos isogênicos saudáveis, do sexo feminino, da raça Swiss (n = 48), com 3 a 4 meses de idade, provenientes do Biotério da UnB, pesando 25–30 g, foram utilizados para a realização deste estudo.

O estudo foi conduzido nos Laboratórios de Parasitologia e de Imunologia da Faculdade de Medicina da UnB. Os animais foram colocados em gaiolas e submetidos às condições do laboratório pelo menos cinco dias antes do início dos experimentos. O ciclo claro/escuro foi de 12 h/12 h e água e alimento para roedores foram disponibilizados *ad libitum*.

#### **4.9.2 Amebas**

Cistos, trofozoítos, bactérias e fungos da placa de cultura da cepa de referência ATCC 30461, bem como cistos, trofozoítos e bactérias do isolado UnB13 colhidos por lavagem com 2 mL de solução salina estéril foram utilizados.

### 4.9.3 Procedimento

Os animais foram levados para câmara de fluxo laminar e anestesiados pela IP com ketamina (80 mg/kg) + xilazina (10 mg/kg). Após a anestesia, 200 µL da suspensão do lavado quantificado da placa de cultura da cepa de referência ATCC 30461 contendo  $11 \times 10^4$  amebas/mL,  $28 \times 10^5$  fungos/mL e  $12,8 \times 10^6$  bactérias/mL foram inoculados pela IP. Alíquota de 200 µL do lavado quantificado da placa UnB13, contendo  $16 \times 10^4$  amebas/mL e  $24 \times 10^6$  bactérias/mL, também foi inoculada pela IP. Para cada isolado, foram inoculados 24 animais (seis animais para cada intervalo de tempo). A recuperação da anestesia foi observada no laboratório e, posteriormente, os animais foram levados ao alojamento de animais da Faculdade de Medicina da UnB.

Após intervalos de 1 h, 6 h, 12 h e 24 h, o inóculo foi recuperado com a exposição do peritônio por meio de incisão de 2 cm na pele dos animais devidamente anestesiados. Foram injetados na cavidade abdominal 12 mL de solução tampão fosfato de sódio gelada a pH 7,2. Após a injeção, foi feita massagem na região e o exsudato peritoneal foi imediatamente recuperado com seringa de 10 mL (85). Os animais, ainda anestesiados, foram sacrificados com injeção de 1 mmol/kg de cloreto de potássio. O exsudato recuperado foi centrifugado a  $447 \times g$  por 15 min. O sobrenadante foi desprezado e ressuspendido em 1 mL de solução salina e os cistos, os trofozoítos, os fungos e as bactérias foram quantificados em hemocítômetro.

### 4.9.4 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando o teste de Bartlett para igualdade de variâncias e o teste de Kolmogorov-Smirnov para a normalidade de sua distribuição antes da análise comparativa. As análises foram realizadas por meio do

teste ANOVA, seguido pelo método de Student-Newman-Keuls para comparar amostras normais múltiplas independentes. O teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn, foi utilizado para comparar amostras múltiplas independentes não normais. Diferenças com valor bicaudal de  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas. O software Prisma 5® (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos) foi utilizado para os testes estatísticos e para a elaboração de um desenho gráfico dos dados.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ISOLADOS

Um total de 19 isolados e a cepa de referência ATCC 30461 foram utilizados no estudo. As amostras foram divididas em: duas de solo, sete de piscina, nove de espelhos d'água e uma de córnea (Tabela 1).

### 5.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Os dados acerca da morfometria e das caracterizações genotípica e fisiológica de 18 isolados ambientais de Brasília, DF, de um isolado de córnea e da cepa de referência ATCC 30461 são apresentados na Tabela 1. Foi possível observar estruturas dos cistos de *Acanthamoeba* como núcleo, ectocisto (parede externa do cisto), endocisto (parede interna do cisto), ostíolo e braços do endocisto (Figura 3). O diâmetro médio dos cistos variou entre 10,6 µm e 16,4 µm (Tabela 1). Nos trofozoítos, foi possível visualizar acantopódios, movimento multidirecional lento e formação de vacúolo (Figura 3).

Houve diferença estatisticamente significativa entre o tamanho dos 19 isolados (Kruskal-Wallis  $H_{18,1900} = 563,9$ ;  $p < 0,01$ ). Os isolados P6 e A10 apresentaram o maior tamanho. Em 10 isolados, foram observados endocistos enrugados (UnB11, UnB13 – solo; UnB3, IP1S1, P4 – piscina; A3, A6, A13, A16 – espelho d'água; CorSP – córnea), os quais foram classificados no grupo II (12). Os outros nove isolados (P3, P6, P7, P9 – piscina; A1, A4, A8, A9, A10 – espelho d'água) apresentaram endocistos arredondados e foram classificados no grupo III (12).

**Tabela 1** – Morfometria e caracterizações genotípica e fisiológica de 18 isolados ambientais de Brasília, DF, de um isolado de córnea e da cepa de referência ATCC 30461.

Isolado	Fonte <sup>1</sup>	GenBank	Genótipo	Sequência de referência <sup>2</sup>		Cisto ( $\mu\text{m}$ , média $\pm$ DP) <sup>3</sup>	Teste de tolerância <sup>4</sup>					
				GenBank	Identidade (%)		Osmotolerância (M – manitol)			Termotolerância (°C)		
							0,5	1,0	1,5	25	30	37
UNB11	S	JF960525	T4	DQ087298	99	11,0 $\pm$ 1,6	–	–	–	+	+	+
UNB13	S	JQ268234	ND <sup>5</sup>	ND	ND	11,9 $\pm$ 1,4	+	+	+	–	+	–
UNB 3	P	JQ268232	T4	EU934064	100	10,6 $\pm$ 1,1	–	+	+	+	+	+
IP1S1	P	JQ268233	T4	U07408	99	13,0 $\pm$ 1,6	+	+	+	+	+	+
P3	P	JQ268235	T5	AB525818	99	13,0 $\pm$ 3,0	–	+	+	–	–	–
P4	P	JQ268236	T4	EF554328	99	13,9 $\pm$ 2,4	–	+	–	–	+	–
P6	P	JQ268237	T5	AB525818	99	14,6 $\pm$ 2,3	–	–	+	–	–	+
P7	P	JQ268238	T5	AB525832	100	12,7 $\pm$ 2,1	–	–	+	–	–	+
P9	P	JQ268239	T5	AB525818	95	11,3 $\pm$ 2,0	+	–	–	–	–	+
A1	EP	JQ268240	T5	AB525832	97	11,2 $\pm$ 2,2	–	–	–	–	–	–
A3	EP	JQ268241	T2/T6	AY026244	97	11,0 $\pm$ 2,0	–	–	–	+	–	–
A4	EP	JQ268242	T5	AB525818	99	12,7 $\pm$ 2,4	+	+	+	–	+	–
A6	EP	JQ268243	T4	HQ450394	99	11,0 $\pm$ 1,7	–	–	–	–	–	–
A8	EP	JQ268244	T5	AB525818	99	11,3 $\pm$ 1,7	–	–	–	+	–	+
A9	EP	JQ268245	ND	ND	ND	11,1 $\pm$ 2,0	–	–	–	–	+	–

**Continua**

## Conclusão

**Tabela 1** – Morfometria e caracterizações genotípica e fisiológica de 18 isolados ambientais de Brasília, DF, de um isolado de córnea e da cepa de referência ATCC 30461.

Isolado	Fonte <sup>1</sup>	GenBank	Genótipo	Sequência de referência <sup>2</sup>		Cisto ( $\mu\text{m}$ , média $\pm$ DP) <sup>3</sup>	Teste de tolerância <sup>4</sup>					
				GenBank	Identidade (%)		Osmotolerância (M – manitol)			Termotolerância (°C)		
							0,5	1,0	1,5	25	30	37
A10	EP	JQ268246	T5	AB525832	97	16,4 $\pm$ 3,5	–	–	–	+	+	+
A13	EP	JQ268247	ND	ND	ND	11,2 $\pm$ 2,0	+	–	–	–	+	+
A16	EP	JQ268248	ND	ND	ND	13,8 $\pm$ 2,5	+	–	–	–	–	+
CorSP	C	ID 1517397	T4	AY026243	100	12,0 $\pm$ 2,6	+	+	+	+	+	+
ATCC <sup>6</sup>	C	AY026243	T4	AY026243	100	15,7 $\pm$ 3,0	+	+	–	+	–	+

<sup>1</sup> S: solo; P: piscina; EP: espelho d'água; C: ceratite.

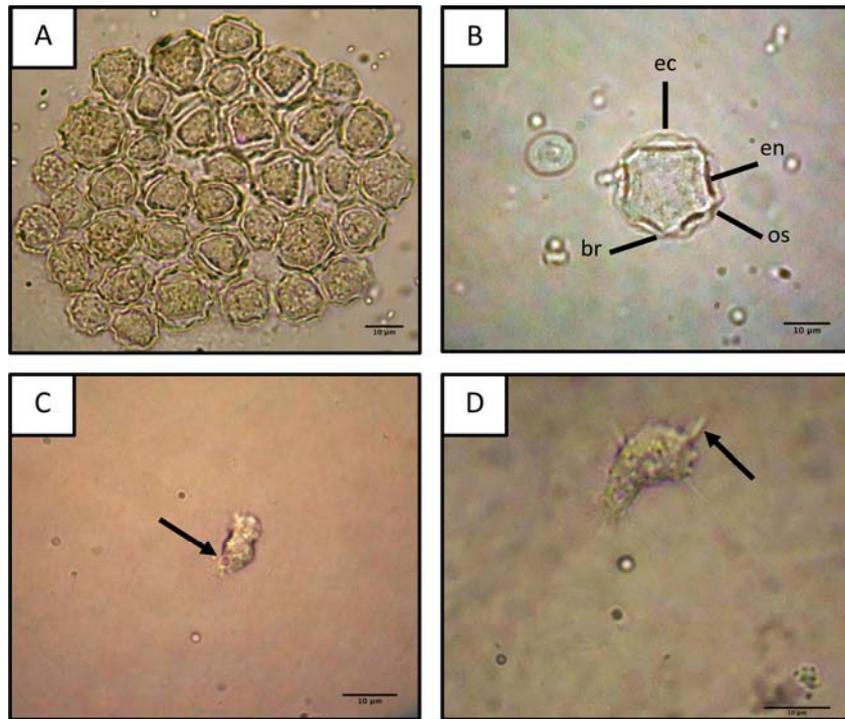
<sup>2</sup> Número de acesso comparando a sequência dos isolados deste estudo ao GenBank e porcentagem de identidade.

<sup>3</sup> Diâmetro de 100 cistos mensurados.

<sup>4</sup> +: presença de zona clara; –: ausência de zona clara. (ver Material e métodos).

<sup>5</sup> ND: gênero *Acanthamoeba* cujo genótipo não foi determinado.

<sup>6</sup> ATCC: cepa de referência *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30461.



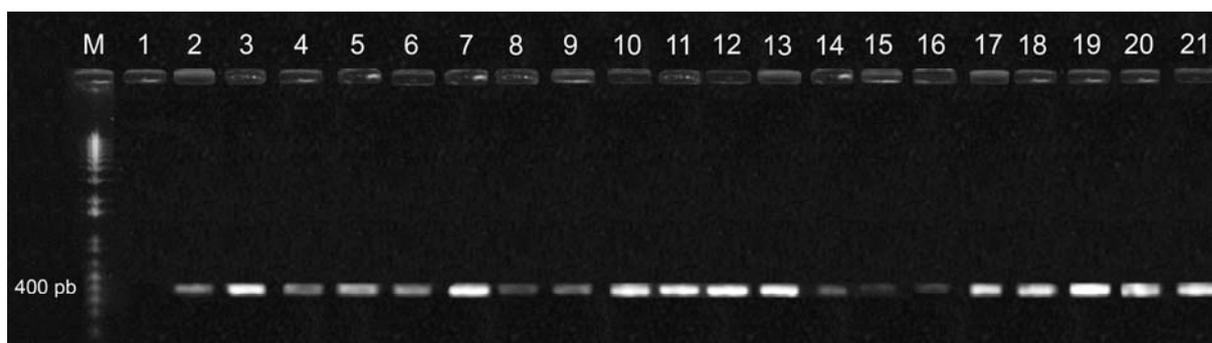
**Figura 3** – Formas de desenvolvimento de um isolado de *Acanthamoeba* proveniente de espelho d’água. **A.** Cistos de *Acanthamoeba* agrupados, ressuspensos em solução de encistamento (80). **B.** Cisto de *Acanthamoeba*; (ec): ectocisto; (en): endocisto; (br): braços do endocisto; (os): ostíolo. **C e D.** Trofozoítos em cultivo axênico com vacúolo (seta em C) e acantopódios (seta em D). Microscópio óptico; aumento: 1000x; escala = 10 µm.

### 5.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

As análises de PCR para a amplificação do gene ASA.S1 (aproximadamente 400 pb) dos isolados foram realizadas em diferentes tempos e as bandas foram agrupadas em uma única imagem para permitir a avaliação comparativa (Figura 4).

As análises de sequências mostraram que os isolados utilizados no estudo são similares aos genótipos T4, T5 e T2/T6. Entre os 19 isolados analisados, oito possuem correspondência com sequências disponíveis do genótipo T5, com identidade variando de 95% a 100%, enquanto seis isolados foram relacionados com

as sequências de referência do genótipo T4, com 99% a 100% de identidade, e um isolado apresentou 97% de identidade com o genótipo T2/T6; os quatro isolados restantes exibiram apenas um padrão de sequência correspondente ao gênero *Acanthamoeba* (Tabela 1).



**Figura 4** – Análise de PCR de isolados de *Acanthamoeba* provenientes de amostras ambientais de Brasília, DF e de ceratite. M: marcador molecular (1 kb ladder plus); 1: controle negativo; 2: cepa de referência *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC 30461); 3: UnB11 (solo); 4: UnB13 (solo); 5: UnB3 (piscina); 6: IP1S1 (piscina); 7: P3 (piscina); 8: P4 (piscina); 9: P6 (piscina); 10: P7 (piscina); 11: P9 (piscina); 12: A1 (espelho d'água); 13: A3 (espelho d'água); 14: A4 (espelho d'água); 15: A6 (espelho d'água); 16: A8 (espelho d'água); 17: A9 (espelho d'água); 18: A10 (espelho d'água); 19: A13 (espelho d'água); 20: A16 (espelho d'água); 21: CorSP (ceratite).

#### 5.4 OSMOTOLERÂNCIA

Entre os 19 isolados submetidos ao experimento de osmotolerância, sete (37%) apresentaram crescimento em presença de manitol 0,5 M, sete (37%) em presença de manitol 1,0 M e oito (42%) em alta osmolaridade (manitol 1,5 M). Os isolados UnB13 (solo), IP1S1 (piscina), A4 (espelho d'água) e CorSP (ceratite) cresceram em todas as osmolaridades. Os isolados P3 e UnB3, ambos de piscina, e a cepa de referência ATCC 30461 cresceram em presença de manitol 1,0 M e 1,5 M. Entre os isolados que cresceram somente em uma osmolaridade, estão: P9

(piscina), A13 e A16 (espelho d'água) a 0,5 M; P4 (piscina) a 1,0 M; P6 e P7 a 1,5 M (Tabela 1).

Houve diferença significativa no tamanho do halo de inibição do crescimento das bactérias entre os 19 isolados cultivados em presença de manitol 1,5 M (teste de Kruskal-Wallis  $H_{18, 57} = 48,9$ ;  $p < 0,01$ ). Nessa osmolaridade, os isolados UnB13 (solo) e IP1S1 (piscina) apresentaram o maior crescimento.

## 5.5 TERMOTOLERÂNCIA

No experimento de termotolerância, sete (37%) isolados apresentaram crescimento a 25°C, 10 (53%) a 30°C e 11 (58%) em alta temperatura (37°C). Os isolados UnB11 (solo), UnB3 (piscina), IP1S1 (piscina), A10 (espelho d'água) e CorSP (ceratite) cresceram em todas as temperaturas. O isolado A8 (espelho d'água) e a cepa de referência ATCC 30461 cresceram nas temperaturas de 25°C e 37°C e o isolado A13 (espelho d'água) cresceu a 30°C e a 37°C. Entre os isolados que apresentaram crescimento em somente uma temperatura, estão: A3 (espelho d'água) a 25°C; UnB13 e P4 (piscina) e A4 e A9 (espelho d'água) a 30°C; P6, P7, P9 (piscina) e A16 (espelho d'água) a 37°C (Tabela 1).

Houve diferença significativa no tamanho do halo de inibição entre os 19 isolados incubados a 37°C (teste de Kruskal-Wallis  $H_{18, 57} = 47,3$ ;  $p < 0,01$ ). Nessa temperatura, os isolados A10 (espelhos d'água), IP1S1 e UnB3 (piscina) apresentaram o maior crescimento.

## 5.6 TESTES DE PATOGENICIDADE *IN VIVO*

A infecção experimental, pela IC e pela IP, revelou que todos os isolados inoculados e a cepa de referência ATCC 30461 podem ser considerados invasivos, pois foram observados nos exames histopatológicos do cérebro dos animais inoculados pela IP (Tabela 2). Não houve diferença significativa na recuperação dos isolados comparando-se o número total de animais positivos entre as vias de inoculação ( $\chi^2 = 0,08$ ;  $p = 0,77$ ).

**Tabela 2** – Classificação dos isolados inoculados (70).

Isolado	Via intracerebral <sup>1</sup>				Via intraperitoneal				Classificação
	Recuperação				Recuperação				
	AI	M	H	C	AI	M	H	C	
UnB11	6	N	+	–	6	N	+	+	Invasivo
IP1S1	6	N	+	–	6	N	+	–	Invasivo
CorSP	6	S	+	+	6	S	+	+	Patogênico e invasivo
ATCC <sup>2</sup>	6	N	+	–	6	N	+	+	Invasivo

<sup>1</sup> AI: animais inoculados; M: morte; H: histopatologia; C: cultura; N: não houve morte; S: houve morte; +: presença de cistos e/ou trofozoítos; –: ausência de cistos e/ou trofozoítos.

<sup>2</sup> ATCC: cepa de referência *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30461.

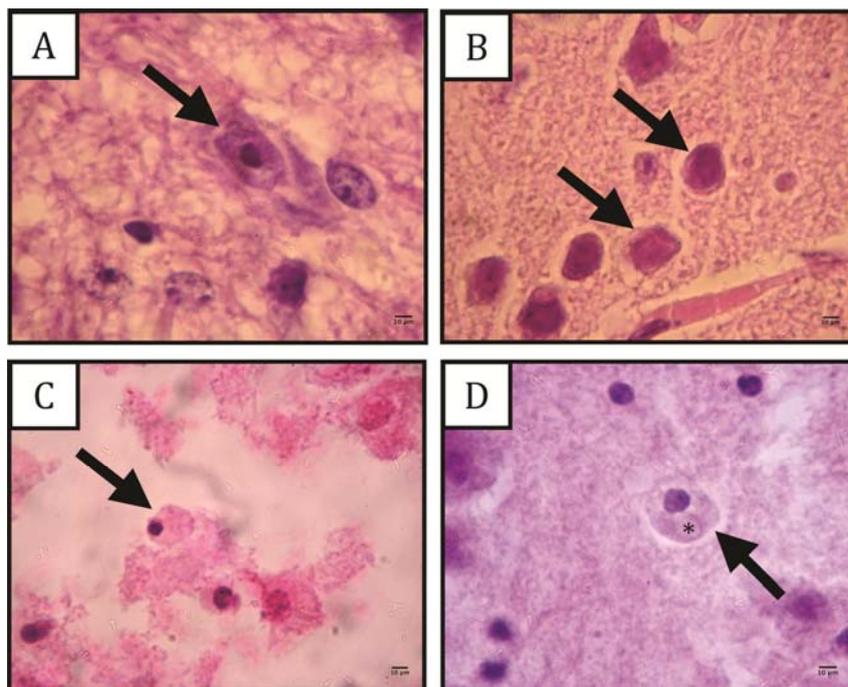
### 5.6.1 Infecção experimental por inoculação intracerebral de trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. em camundongos isogênicos

Na IC, a recuperação dos isolados por histopatologia e por cultura foi estatisticamente diferente ( $\chi^2 = 6,45$ ;  $p < 0,01$ ), tendo sido maior por histopatologia. Todos os isolados apresentaram histopatologia do cérebro positiva para pelo menos um animal (Tabela 3, Figura 5). Os isolados UnB11 e IP1S1 apresentaram histopatologia positiva em dois (30%) dos seis animais e a ATCC 30461, em um animal (17%). O isolado CorSP foi o único que causou óbito (todos os animais inoculados morreram após 24 h da inoculação), suas formas de vida foram observadas na histopatologia de todos os animais inoculados e este foi o único isolado a ser recuperado na cultura (Tabela 3).

**Tabela 3** – Isolados inoculados pela via intracerebral e recuperados por histopatologia e cultura nos animais inoculados.

Animal	Isolado <sup>1</sup>							
	UnB11		IP1S1		CorSP		ATCC 30461	
	H	C	H	C	H	C	H	C
1	–	–	–	–	+	+	+	–
2	+	–	+	–	+	–	–	–
3	–	–	+	–	+	–	–	–
4	–	–	–	–	+	–	–	–
5	+	–	–	–	+	+	–	–
6	–	–	–	–	+	+	–	–
Total	2	0	2	0	6	3	1	0

<sup>1</sup> H: histopatologia do tecido cerebral; C: cultura; +: presença de cistos e/ou trofozoítos; –: ausência de cistos e/ou trofozoítos.



**Figura 5** – Cortes histológicas do cérebro dos animais inoculados pela via intracerebral. **A.** Trofozoíto (seta) do isolado de solo UnB11. **B.** Cistos (setas) do isolado de piscina IP1S1. **C e D.** Trofozoítos (seta) do isolado de ceratite CorSP, com vacúolo (\*) evidente. Microscópio óptico; aumento: 1000x; escala = 10  $\mu$ m.

### 5.6.2 Infecção experimental por inoculação intraperitoneal de trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. em camundongos isogênicos

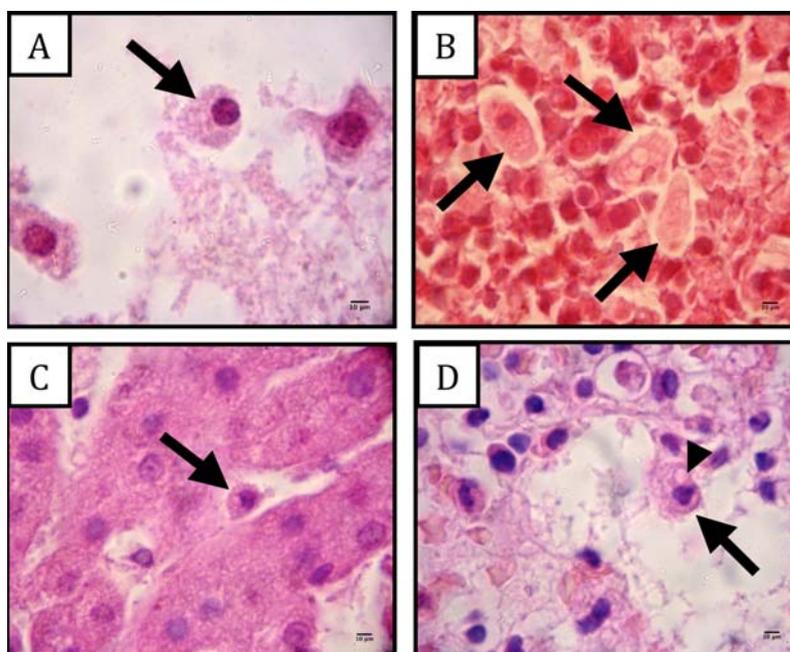
Na IP, não houve diferença estatística entre a recuperação dos isolados por histopatologia e cultura considerando o número total de animais positivos por cada método ( $\chi^2 = 0,36$ ;  $p = 0,55$ ). Adicionalmente, o número total de órgãos positivos por histopatologia e cultura foi igual ( $n = 12$ , Tabela 4). Todos os animais apresentaram histopatologia positiva para o cérebro de pelo menos um animal inoculado, demonstrando a presença de amebas no SNC, o que comprova sua invasividade. O isolado UnB11 e a cepa de referência ATCC 30461 apresentaram histopatologia e cultura positivas no rim de um dos animais inoculados. Três dos seis animais inoculados com o isolado patogênico CorSP morreram após 48 h da inoculação. Um desses animais apresentou histopatologia e cultura do baço e do fígado positivas e histopatologias de pulmão, rins e cérebro também positivas (Tabela 4, Figuras 6 e

7). A cepa de referência ATCC 30461, além de ter sido observada na histopatologia do cérebro e do baço, foi a única com cultura positiva para o cérebro (Figura 7C).

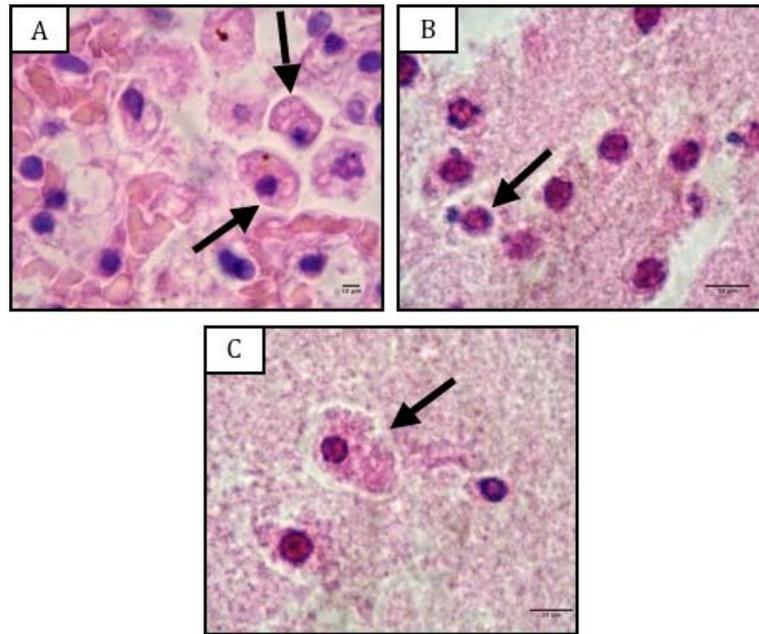
**Tabela 4** – Isolados inoculados pela via intraperitoneal e animais com histopatologia e cultura positivas nos órgãos recuperados.

An <sup>1</sup>	Isolado																			
	UnB11					IP1S1					CorSP					ATCC 30461				
	Cr	P	F	B	R	Cr	P	F	B	R	Cr	P	F	B	R	Cr	P	F	B	R
1	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	H	H	H/C	H/C	C	-	-	-	H	-
2	H	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	H	-	-	-	C
3	H	-	-	H	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	C	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	H	-	-	-	C
5	H	-	-	C	-	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup> An: animal; Cr: cérebro; P: pulmão; F: fígado; B: baço; R: rim; H: histopatologia; C: cultura; -: histopatologia e cultura negativas nos órgãos.



**Figura 6** – Trofozoítos (setas) com vacúolo (cabeça de seta) do isolado de ceratite (CorSP) observados em cortes histológicos de órgãos dos animais inoculados pela via intraperitoneal. **A.** Cérebro. **B.** Baço. **C.** Fígado. **D.** Pulmão. Microscópio óptico; aumento: 1000x; escala = 10 µm.

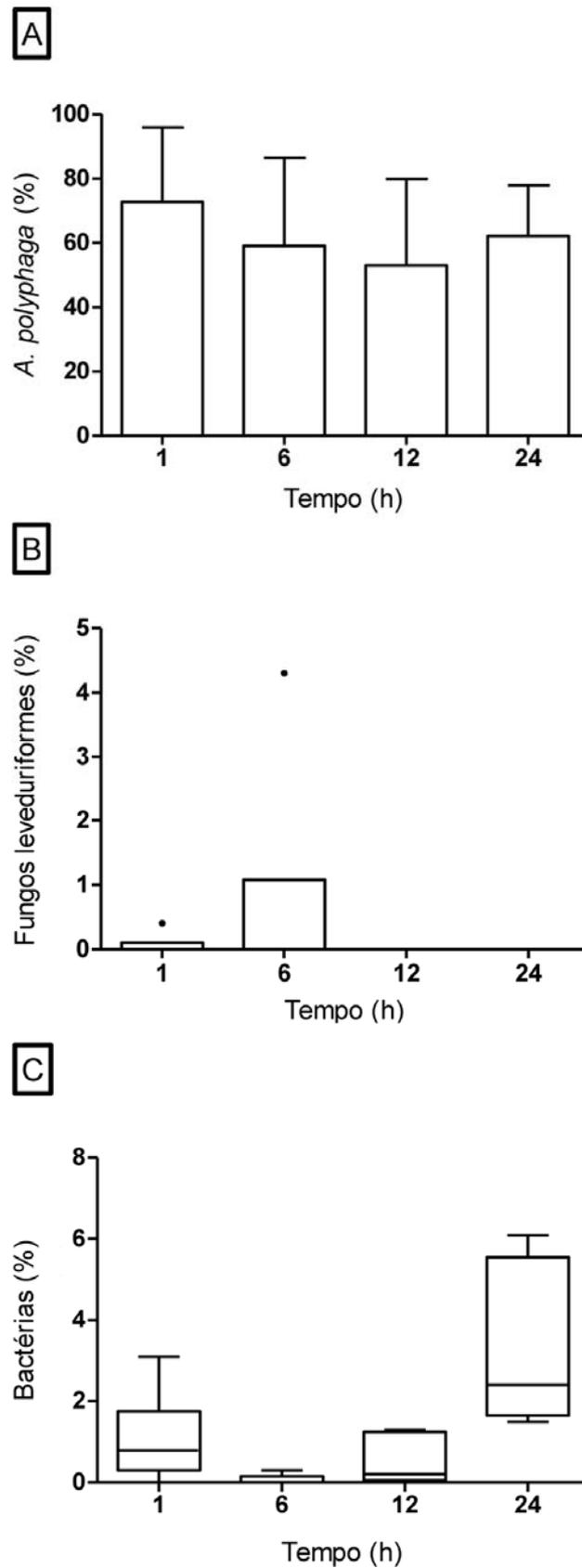


**Figura 7** – Trofozoítos observados em cortes histológicos de órgãos dos animais inoculados pela via intraperitoneal. **A.** Trofozoítos (seta) do isolado CorSP, no pulmão. **B.** Cisto do isolado CorSP com parede enrugada (seta), no cérebro. **C.** Trofozoíto da cepa de referência *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC 30461), no cérebro. Microscópio óptico; aumento: 1000x; escala = 10 µm.

## 5.7 PURIFICAÇÃO *IN VIVO* DE CULTURAS CONTAMINADAS

### 5.7.1 Tentativa de purificação *in vivo* de uma placa de cultura de *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC 30461)

O estudo da utilização do peritônio de camundongos não sensibilizados para purificar a placa de cultura da cepa de referência ATCC 30461 contaminada com fungos e bactérias mostrou que não houve diferenças nas médias do percentual de amebas inoculadas em relação ao número de amebas obtidas no lavado peritoneal nos diferentes tempos: 1 h ( $72,7 \pm 56,6$ ), 6 h ( $59,1 \pm 67,1$ ), 12 h ( $53,0 \pm 65,9$ ) e 24 h ( $74,5 \pm 26,8$ ) ( $p > 0,05$ ) (ANOVA seguida pelo método de Student-Newman-Keuls) (Figura 8A).



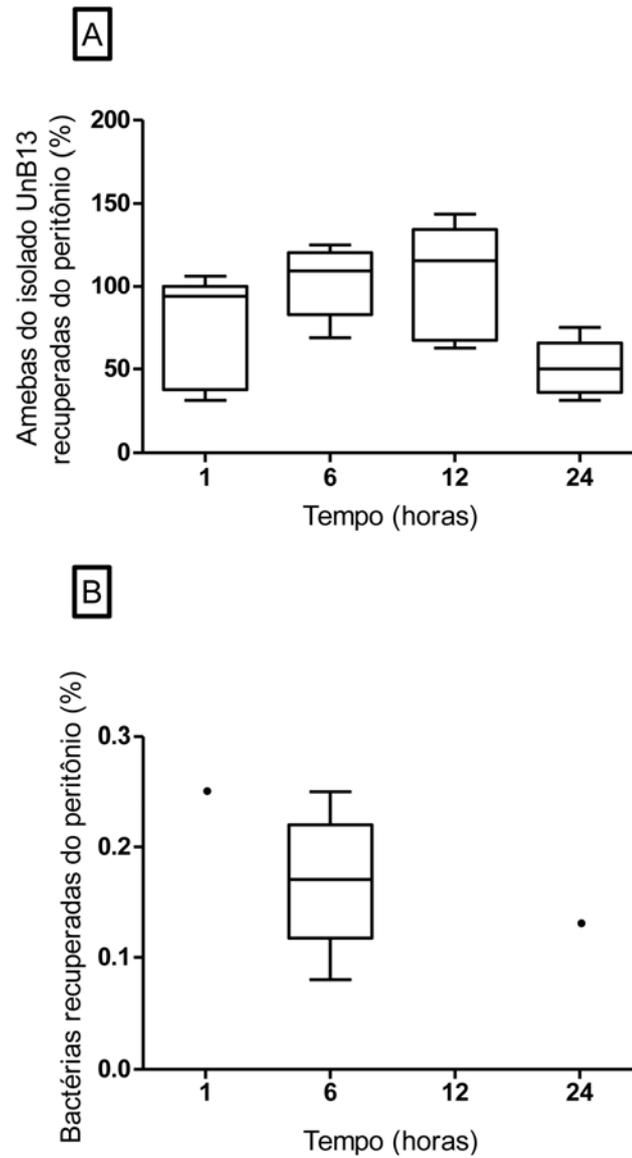
**Figura 8** – Percentual de *Acanthamoeba polyphaga* ( $10^5/\text{mL}$ ), fungos leveduriformes ( $2,8 \times 10^6/\text{mL}$ ) e bactérias ( $12,8 \times 10^6/\text{mL}$ ) recuperados no lavado peritoneal dos camundongos ( $n = 6$ ) a diferentes intervalos de tempo.

A quantificação dos fungos no lavado peritoneal mostrou que as medianas para o percentual destes micro-organismos foram nulas em todos os tempos avaliados, com exceção dos dois pontos discrepantes observados para 1 h e 6 h, equivalentes a 0,4% e 4,3%, respectivamente (Figura 8B). Para as bactérias, os resultados, analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn, mostraram que a mediana do percentual para 1 h (0,8%) foi menor do que para 24 h (2,4%) ( $p < 0,05$ ); para os demais tempos, as medianas foram semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ) (Figura 8C).

### **5.7.2 Tentativa de purificação *in vivo* de uma placa de cultura do isolado de solo UnB13**

Com a utilização do lavado peritoneal para a purificação da placa do isolado de solo UnB13, verificou-se que os percentuais de amebas recuperadas nos intervalos de 6 h e 12 h foram maiores do que no intervalo de 24 h. Houve diferenças nas médias do percentual de amebas inoculadas em relação ao número de amebas obtidas no lavado peritoneal nos diferentes tempos, alterando as médias para 6 h ( $103,2 \pm 21,92$ ), 12 h ( $106,3 \pm 33,3$ ) e 24 h ( $51,1 \pm 16,48$ ) ( $p < 0,05$ ) (ANOVA seguida pelo método de Student-Newman-Keuls) (Figura 9A).

No lavado, não houve presença de fungos. Para as bactérias, os resultados, analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn, mostraram que a mediana do percentual para 6 h (0,17%) foi maior do que as medianas para os demais tempos, as quais foram nulas ( $p < 0,05$ ), com exceção de dois pontos discrepantes para 1 h e 24 h, equivalentes a 0,25% e 0,13%, respectivamente (Figura 9B).



**Figura 9** – Percentual de amebas do isolado UnB13 ( $16 \times 10^4$ /mL) e bactérias ( $24 \times 10^6$ /mL) recuperadas no lavado peritoneal dos camundongos ( $n = 6$ ) a diferentes intervalos de tempo.

## 6 DISCUSSÃO

O relato de isolados de *Acanthamoeba* similares aos genótipos T4, T5 e T2/T6 em amostras de solo e de água de Brasília, DF, apresentado em artigo aceito para publicação no periódico *Experimental Parasitology* (ANEXO 2 e APÊNDICE 1), é inédito. A presença de isolados ambientais com potencial patogênico pode ser decorrente da elevada resistência dos cistos às condições ambientais e aos sistemas de desinfecção utilizados em piscinas.

Foram observados, neste estudo, endocistos enrugados e lisos e os isolados foram caracterizados, com base na morfologia dos cistos, nos grupos II e III, respectivamente (12). As espécies pertencentes a esses grupos são morfologicamente muito semelhantes e, frequentemente, associadas a infecções humanas, especialmente encefalite e ceratite (43). O grupo II também contém espécies de *Acanthamoeba* mais comumente relacionadas a isolados ambientais (20, 86).

A variação morfológica significativa de diâmetro e forma do cisto entre os 19 isolados estudados corrobora o fato de que a identificação de espécies de *Acanthamoeba* com base apenas em características morfológicas é problemática, como observado em outros estudos (16, 23, 39, 71). Além disso, como relatado na literatura, os meios de cultura em procedimentos *in vitro* podem modificar a morfologia de isolados de uma mesma espécie (20).

Neste estudo, todos os isolados apresentaram características morfológicas do gênero *Acanthamoeba*, o que foi confirmado por meio de PCR. Entre as amostras estudadas, seis isolados foram caracterizados como similares ao genótipo T4, por sua estrita correspondência com as sequências de referência deste genótipo, uma vez que a identidade entre as sequências obtidas e as sequências de referência variou entre 99% e 100%. Relatos da literatura revelam que a grande maioria dos isolados de *Acanthamoeba*, provenientes de ceratite e de amostras ambientais, pertence ao genótipo T4 (3, 49, 87). Alguns autores sugerem que o genótipo T4 compreende espécies do complexo *A. castellanii* (21, 86, 87). No presente caso, entretanto, o genótipo T5 foi o mais frequente em isolados de piscinas e espelhos

d'água, fato também observado em outro estudo (44), em que foi encontrada maior prevalência do genótipo T5 entre isolados provenientes de água.

O genótipo T5 já foi isolado em amostra de mucosa humana sem infecção amebiana e relacionado com maior resistência a múltiplas soluções de limpeza de lente de contato quando comparado ao genótipo T4 (88). Além disso, também já foi descrito em casos de ceratite (89). A exposição de usuários de lentes de contato, bem como de pessoas com microtraumas na córnea, a esses ambientes aquáticos representa fator de risco para ceratite.

O isolado de piscina UnB3 mostrou identidade de 99% com a sequência de referência disponível do genótipo T4 (EU934064), isolada de uma amostra de solo iraniano. Esse isolado referência foi descrito como um fator importante na causa de ceratite por *Acanthamoeba* em usuários de lentes de contato, também tendo sido observada alta frequência do genótipo T4 em isolados do solo (90).

O isolado de solo UnB11 apresentou 99% de identidade com uma cepa patogênica de *Acanthamoeba* sp. isolada de infecção ocular pertencente ao genótipo T4 (GenBank – DQ087298) (91). Na Áustria, um menino da zona rural, com 25 meses de idade, apresentou hemiparesia como consequência de abscessos cerebrais causados por *Acanthamoeba*, diagnosticada por intermédio de PCR. O diagnóstico revelou, ainda, *Acanthamoeba* pertencente ao grupo II e ao genótipo T4, reconhecido como o tipo predominantemente relacionado à EAG em seres humanos (92).

Embora não tenha apresentado crescimento no ensaio de osmotolerância, na infecção experimental o isolado de solo UnB11 foi termotolerante e foi observado no cérebro dos animais inoculados pela IC e no baço e no cérebro dos animais inoculados pela IP. Além disso, foi possível recuperar formas de desenvolvimento viáveis no baço e rins desses animais, demonstrando a capacidade de translocação desse isolado, embora não tenha sido capaz de causar a morte dos animais. Em outro estudo, camundongos foram experimentalmente infectados com isolados de água pela IN, tendo-se observado 6,5% de patogenicidade, com a morte dos animais e a recuperação de cistos e/ou trofozoítos nos tecidos. Naquele caso, os isolados, considerados apenas invasivos, podem não ter causado a morte dos animais porque o intervalo de 21 dias utilizado pode ter sido insuficiente (70). Portanto, alterações no protocolo do teste de patogenicidade *in vivo*, utilizado no

presente estudo, como inoculação pela IN e aumento do período de observação, podem ser válidas para avaliar outros isolados.

O isolado A3 (espelho d'água), similar ao genótipo T2/T6, revelou alta porcentagem de identidade (97%) com a cepa de referência ATCC 30872, proveniente do meio ambiente, do genótipo T4 (93). Ademais, a classificação atual é feita com base na sequência de nucleotídeos da região 18S do rRNA, avaliando-se as semelhanças entre as sequências e respeitando-se o critério de divergência de 5% (20). Recentemente, foram apresentados dados genéticos e filogenéticos da cepa *A. polyphaga* ATCC 30872 que mostraram sua semelhança com os genótipos T2 e T6, propondo-se a retirada do termo *polyphaga* de seu nome e a sua reclassificação no genótipo T2/T6 (21).

Além disso, várias cepas pertencentes ao genótipo T2 foram associadas a casos humanos de ceratite e encefalite (55, 94). O genótipo T6 tem sido associado a casos de ceratite e, em um isolado patogênico de ceratite, foi relatada expressão de um gene de serina proteinase (71, 95). No entanto, outros ensaios de patogenicidade são necessários para avaliar o potencial patogênico do isolado A3 do presente estudo, uma vez que não foi observado crescimento em alta temperatura e alta osmolaridade.

A capacidade que espécies de *Acanthamoeba* apresentam de crescer sob condições de alta osmolaridade e/ou alta temperatura pode estar relacionada a seu potencial patogênico, pois o manitol e a temperatura elevada são inibidores de espécies não patogênicas (16, 51, 60, 61). No presente estudo, cinco isolados (UnB3, IP1S1, P6, P7 e CorSP) cresceram em presença de manitol 1,5 M e a 37°C. Entre esses, três isolados exibiram identidade (de 99% a 100%) com o genótipo T4 (UnB3, IP1S1 e CorSP) e os outros dois (P6 e P7), com o genótipo T5 (de 99% a 100%). Os isolados IP1S1 e CorSP foram utilizados na infecção experimental, sendo considerados invasivos. O isolado IP1S1 foi um dos que apresentou o maior halo de inibição em presença de manitol 1,5 M e a 37°C. Além disso, apresentou histopatologia positiva do cérebro na IC e IP. O isolado CorSP, osmotolerante e termotolerante, foi considerado patogênico, pois, além de causar a morte dos animais, foi recuperado na histopatologia e na cultura.

O fato de um isolado ser proveniente de ceratite não lhe confere a capacidade de atravessar a BHE e estabelecer a EAG. No presente caso, o isolado CorSP

apresentou 100% de identidade com a sequência da cepa de referência ATCC 30461, pertencente ao genótipo T4, e exibiu maior adaptação ao crescimento em condições desfavoráveis e no hospedeiro. Já ficou demonstrada a capacidade da *A. polyphaga* de causar apoptose em células do SNC (56). Embora o isolado CorSP tenha se mostrado patogênico nos testes *in vivo* e mais adaptado à alta osmolaridade do que a cepa de referência ATCC 30461, esta cresceu a 37°C e foi a única com cultura do cérebro positiva na IP, comprovando a capacidade que os trofozoítos têm de sobreviver no tecido. O isolado CorSP foi proveniente de ceratite e, no Brasil, mais especificamente no município de São Paulo, um isolado de água de torneira também apresentou alta porcentagem de identidade com a cepa de referência ATCC 30461 (49).

Em relação à cepa de referência ATCC 30461, escolhida neste estudo, nenhum crescimento foi observado em presença de manitol 1,5 M, o que poderia ser esperado, pois já foi mostrado o efeito negativo do sacarídeo sobre o crescimento dos trofozoítos de modo dependente de sua concentração (49). No entanto, sabe-se que a cepa de referência ATCC 30461, comprovadamente patogênica, apresenta crescimento em presença de manitol 1,0 M, o que foi comprovado com o resultado do teste de osmotolerância do presente estudo (16, 24). Em adição a isso, os isolados de *A. polyphaga* possuem características morfológicas e fisiológicas distintas (crescimento em meio líquido PYG, efeito citopático em células de cultura, número de acantopódios, presença de estruturas locomotoras, aderência a plástico e invasão de matriz de colágeno) (52).

Nos Estados Unidos, foi descrita a técnica de osmotolerância e, entre 14 isolados ambientais inicialmente submetidos a ela, houve crescimento de sete (50%) (16). No Brasil, observou-se crescimento e viabilidade em quatro (40%) dos 10 isolados cultivados em condições de alta osmolaridade (58). Na Espanha, registrou-se crescimento em alta osmolaridade de 100% dos 21 isolados provenientes de areia da praia (60). Na Turquia, entre 18 isolados provenientes de amostras ambientais estudados, houve crescimento em alta osmolaridade de 12 (66,6%) (59).

Nos testes de patogenicidade *in vitro*, foi possível observar no presente estudo tanto a zona clara de expansão do crescimento das amebas quanto trofozoítos viáveis em quase todos os isolados. É importante ressaltar que as ferramentas que permitem avaliar a patogenicidade de isolados ambientais devem

ser utilizadas em conjunto para a confirmação dos dados. De acordo com a literatura, os ensaios *in vivo* geralmente corroboram os achados obtidos *in vitro* (39, 48). Todos os isolados utilizados na infecção experimental neste estudo apresentaram similaridade com o genótipo T4 e foram considerados invasivos. No México, em um ensaio de patogenicidade, 6,5% dos isolados inoculados foram classificados como patogênicos, 29% como invasivos e 64,5% como não patogênicos (70). Na Coreia, isolados de *Acanthamoeba* mantidos em cultura desde o isolamento primário demonstraram menor virulência quando comparados com isolados de tecido cerebral de camundongos infectados pela IN. Os isolados que já tinham passado pelo menos duas vezes pelo tecido cerebral de animais infectados causaram óbito precoce e induziram maior taxa de mortalidade em comparação com a que foi determinada pelas cepas do isolamento primário mantidas em cultura (65,5% contra 2,8%, respectivamente) (67). Na Bélgica, as características de crescimento, efeito citotóxico em culturas de células e virulência de 19 espécies do gênero *Acanthamoeba*, de diversos isolados ambientais, foram avaliadas em camundongos (48). Na Suíça, isolados de *Acanthamoeba* provenientes de resorts foram incubados a 37°C, sendo considerados como termotolerantes aqueles que apresentaram crescimento, o que foi confirmado por testes de patogenicidade *in vivo*, utilizando inoculação pela IN em camundongos (39).

No presente caso, foram utilizadas somente a histopatologia e a cultura para a recuperação dos isolados e o período de observação foi de 21 dias. Os usos de várias técnicas para a recuperação e de prazos mais longos de observação podem potencializar o encontro de isolados patogênicos. Em trabalho utilizando PCR para detectar a presença de *Acanthamoeba* nos tecidos de animais infectados pela IN, foram encontrados produtos de PCR nos pulmões e no cérebro de todos os animais imunossuprimidos infectados (39).

Embora tenha ocorrido o óbito somente de animais inoculados com o isolado CorSP neste estudo, a detecção de cistos e trofozoítos dos outros isolados, ainda que somente por histopatologia, demonstra a capacidade da ameba de atravessar a BHE e de se estabelecer no órgão-alvo, no caso dos animais inoculados pela IP. Nos animais inoculados pela IC, a presença de amebas no cérebro indica sua capacidade de permanência no órgão onde foram inoculadas.

Na década de 1980, demonstrou-se que o efeito citopático não foi seguido pela patogenicidade em camundongos inoculados com isolados de *Acanthamoeba*, evidenciando-se que modelos experimentais podem diferir em suscetibilidade e a via de inoculação também pode exercer influência sobre a patogenicidade (48).

Os achados do presente estudo mostraram o potencial do peritônio de camundongos para a purificação de culturas contaminadas de ameba. Os resultados demonstraram que, decorrida 1 h da injeção IP do lavado da cultura da cepa de referência ATCC 30461, foi possível eliminar no mínimo 95,7% dos fungos e 97,6% das bactérias, além de ter havido a recuperação de 72% das amebas.

Com exceção do tempo de 6 h, todos os outros intervalos de tempo foram úteis na eliminação das bactérias da cultura do isolado UnB13 e, após 12 h da injeção IP do lavado, foi possível recuperar 106,2% de amebas. Isso significa que as amebas se multiplicaram na cavidade peritoneal dos camundongos, pois os cistos de *Acanthamoeba* transformam-se em trofozoítos sob condições favoráveis de suprimento, pH neutro e temperatura apropriada, perdendo a dupla camada e se reproduzindo ativamente (3). O intervalo de 1 h também foi útil na purificação da cultura do isolado de solo UnB13, uma vez que foi possível eliminar 100% das bactérias e recuperar 61% das amebas. Os pontos discrepantes podem ter sido observados em decorrência de contaminação durante a realização da técnica. No que diz respeito à execução da técnica, o intervalo de 1 h seria o mais acessível na rotina do laboratório de pesquisa.

Como os macrófagos são encontrados em tecido intacto, como o peritônio, e fazem parte da imunidade inata, esta via de inoculação foi escolhida. Em ambas as placas, os macrófagos peritoneais foram capazes de diminuir as bactérias suscetíveis já no intervalo de 1 h por intermédio de fagocitose, da produção de óxido nítrico (NO), sob a ação de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, e do peróxido de hidrogênio. Na placa de cultura da cepa de referência ATCC 30461, a diminuição dos fungos igualmente ocorreu por meio da fagocitose dos macrófagos, ativada por IFN- $\gamma$ , além das outras citocinas (97).

Não obstante as cepas patogênicas de *Acanthamoeba* serem resistentes à lise mediada pelo complemento, a via do complemento juntamente com os fagócitos são eficazes na destruição destas. Em estudo sobre a espécie patogênica *A. culbertsoni*, verificou-se que esta foi mais resistente à lise pelo complemento do que

*A. polyphaga* e *A. castellanii*; por outro lado, os macrófagos ativados tiveram maior capacidade de lisar amebas (79). Os cistos possuem poucos antígenos de superfície e, como os trofozoítos de espécies patogênicas de *Acanthamoeba* são capazes de destruir macrófagos inativados e ativados pela ingestão ou pela emissão de pseudópodes seguida por lise, neste estudo, a recuperação das amebas do peritônio não foi alterada em relação ao inóculo na cultura da cepa de referência ATCC 30461. Já na purificação da cultura UnB13, no intervalo de 24 h, houve diminuição da porcentagem de amebas recuperadas, o que pode ser explicado por sua suscetibilidade à lise pelo complemento e ação dos macrófagos. Deve-se salientar que o genótipo do isolado UnB13 não foi determinado durante a comparação de sua sequência com as sequências de referência do Genbank.

O presente estudo revelou a presença de isolados provenientes do meio ambiente e um de ceratite que demonstraram seu potencial patogênico por meio dos testes de osmotolerância e termotolerância. Alguns deles também apresentaram características de invasividade ao ganhar a corrente sanguínea, tendo sido observados nos exames histopatológicos tanto na IC como na IP e, no caso do isolado CorSP, chegando a causar óbito.

Diante dos dados apresentados, pode-se afirmar que existem isolados potencialmente patogênicos nos ambientes estudados de Brasília, DF e que há risco, pelo menos em tese, de que usuários de piscinas entrem em contato com estes patógenos. Em adição a isso, caso a relação entre fatores diretos e indiretos de virulência com o sistema imunitário do hospedeiro seja favorável ao desenvolvimento do potencial patogênico dessas amebas, é provável que se passe a observar o surgimento de casos de infecções causadas por *Acanthamoeba* em seres humanos, principalmente em condições de maior suscetibilidade, como ocorre em indivíduos diabéticos, soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana, desnutridos, imunossuprimidos, etilistas, entre outros. Vale ressaltar que as razões implicadas e os mecanismos envolvidos na mudança do estado de vida livre para a forma parasitária e patogênica ainda permanecem desconhecidos (39).

Nas últimas décadas, o gênero *Acanthamoeba* vem atraindo crescente interesse no meio científico (39, 98, 99), principalmente pelos múltiplos papéis que desempenha no ecossistema, atuando, ao mesmo tempo, como predador e vetor/reservatório (pelo mecanismo de cavalo de Troia) de micro-organismos (98).

Os isolados ambientais descritos no presente estudo merecem especial atenção, uma vez que foram coletados em locais frequentados por pessoas de diversas idades e com capacidade imunitária variada. Nesses isolados, foram observadas características de patogenicidade e, por esta razão, pode-se aventar a possibilidade de risco eventual de se estabelecerem como agentes de doenças em humanos. Entretanto, outros estudos são necessários para que se possa melhor entender se esses isolados possuem mecanismos para burlar o sistema imunitário, romper barreiras fisiológicas, aumentar o potencial patogênico, produzir enzimas capazes de perturbar a integridade dos endotélios e da membrana celular, colonizar vários órgãos e causar doenças em alguns deles.

## 7 CONCLUSÕES

- Este trabalho representa o primeiro relato da presença de isolados de *Acanthamoeba* similares aos genótipos T4, T5 e T2/T6 em amostras de solo, piscina e espelhos d'água de Brasília, DF.

- Houve avanço no isolamento de *Acanthamoeba* em Brasília, DF, uma vez que, a partir do isolamento, o estudo evoluiu para a caracterização genotípica e a avaliação de parâmetros físicos e biológicos de patogenicidade.

- Confirmou-se o gênero dos isolados utilizando a técnica de PCR e os iniciadores JDP1 e JDP2 específicos para o gênero *Acanthamoeba*.

- Isolados similares ao genótipo T4, relacionado com espécies patogênicas aos seres humanos, foram detectados neste estudo.

- A patogenicidade do isolado de ceratite (CorSP) foi comprovada por seu crescimento em alta osmolaridade e alta temperatura, bem como pelos resultados dos testes de patogenicidade *in vivo*.

- Foi possível demonstrar a capacidade de disseminação hematogênica do isolado de ceratite (CorSP), que resultou na morte dos animais, com posterior recuperação de formas de desenvolvimento deste isolado nos órgãos e tecidos dos camundongos.

- A capacidade de invasividade dos isolados UnB11 (solo) e CorSP (ceratite) também foi demonstrada, tendo sido observado o crescimento de formas de desenvolvimento por meio de exames histopatológicos e concluída, com sucesso, a recuperação destas em placas de cultura.

- A cavidade peritoneal demonstrou utilidade para a recuperação de cistos e trofozoítos, além de promover a redução da quantidade de fungos e bactérias em uma placa de cultura da cepa de referência ATCC 30461 e de bactérias do isolado UnB13 já no intervalo de 1 h

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todas as técnicas foram realizadas em parceria com laboratórios da própria UnB e de outras universidades. O trabalho com organismos tão resistentes abriu-nos um leque de possibilidades e novas habilidades.

A técnica de purificação *in vivo* com recuperação após 1 hora poderá ser utilizada em outros isolados, sobretudo ambientais, que apresentem contaminação.

A infecção experimental, embora válida para a demonstração da patogenia dos micro-organismos aqui estudados, é bastante onerosa. A dificuldade do trabalho com modelos experimentais deve ser considerada, uma vez que envolve manipulação de animais, domínio da técnica de dissecação para a retirada dos órgãos de modo intacto, habilidade com técnicas histológicas, sacrifício de grande quantidade de animais, longo período de observação quanto a mudanças fisiológicas nos modelos estudados, manutenção da alimentação e despesas com o alojamento dos animais, o que torna este tipo de estudo um grande desafio.

Mudanças no protocolo, como variações no período de observação, aprimoramento da inoculação pela via intracerebral com exposição da calota craniana e utilização de outras ferramentas para a recuperação podem potencializar o encontro de isolados patogênicos.

Em relação à genotipagem, as análises de sequências poderão ser úteis na classificação dos isolados que apresentaram genótipo não definido.

Por fim, ficamos com a certeza da necessidade de avançar no presente estudo para que, se não pudermos desvendar todos os mistérios envolvidos na patogenia dessas amebas, possamos ao menos conhecê-los em maior profundidade.

## REFERÊNCIAS

1. Page FC. An illustrated key to freshwater and soil amoebae with notes on cultivation and ecology. Ambleside: Freshwater Biological Association; 1976. (Scientific Publication no. 34).
2. Martinez AJ, Visvesvara GS. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol.* 1997;7(1):583–98.
3. Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev.* 2006;30(4):564–95.
4. Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(2):273–307.
5. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-*opportunistic* pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol.* 2004;34(9):1001–27.
6. Szénási Z, Endo T, Yagita K, Nagy E. Isolation, identification and increasing importance of ‘free-living’ amoebae causing human disease. *J Med Microbiol.* 1998;47(1):5–16.
7. Silva MA, Rosa JA. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. *Rev Saúde Pública* 2003;37(2):242–6.
8. Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup Ø, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MFJR. The new higher level classification of Eukaryotes with emphasis on the taxonomy of Protists. *J Eukaryot Microbiol.* 2005;52(5),399–451.

9. Ma P, Visvesvara GS, Martinez AJ, Theodore FH, Daggett PM, Sawyer TK. *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections: review. *Rev Infect Dis*. 1990;12(3):490–513.
10. Clarke DW, Niederkorn JY. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Trends Parasitol*. 2006;22(4):175–80.
11. Duarte AG, Sattar F, Granwehr B, Aronson JF, Wang Z, Lick S. Disseminated acanthamoebiasis after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2006;25(2):237–40.
12. Pussard M, Pons R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica* 1977;13:557–98.
13. Visvesvara GS. Classification of *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis*. 1991;13(suppl. 5):S369–72.
14. Rondanelli EG, Scaglia M. Atlas of human protozoa. Milano: Masson; 1993.
15. Alves DSMM. Isolamento e caracterização morfológica de Amebas de Vida Livre em amostras de solo e água de piscina no Distrito Federal. 2006 [dissertação]. Brasília, DF: Universidade de Brasília; 2006 [acesso em 2012 Jan 5. Disponível em:  
[http://repositorio.bce.unb.br/bitstream/10482/4774/1/2006\\_Daniella%20de%20So%20usa%20Mendes%20Moreira%20Alves.pdf](http://repositorio.bce.unb.br/bitstream/10482/4774/1/2006_Daniella%20de%20So%20usa%20Mendes%20Moreira%20Alves.pdf)
16. Khan NA, Jarroll EL, Paget TA. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. *Curr Microbiol*. 2001;43(3):204–8.
17. Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, Fuerst PA, Byers TJ. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from human with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol*. 2001;39(5):1903–11.

18. Mahmoudi MR, Taghipour N, Eftekhari M, Haghghi A, Karanis P. Isolation of *Acanthamoeba* species in surface waters of Gilan province-north of Iran. *Parasitol Res.* 2012;110(1):473–7.
19. Gast RJ, Ledee DR, Fuerst PA, Byers TJ. Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *J Eukaryot Microbiol.* 1996;43(6): 498–504.
20. Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodriguez-Zaragoza S, Dean CL, Fuerst PA, Byers TJ. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J Eukaryot Microbiol.* 1998;45(1):45–54.
21. Corsaro D, Venditti D. Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitol Res.* 2010;107(1):233–8.
22. Nuprasert W, Putaporntip C, Pariyakanok L, Jongwutiwes S. Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. *J Clin Microbiol.* 2010;48(12):4636–40.
23. Magliano AC, Teixeira MM, Alfieri SC. Revisiting the *Acanthamoeba* species that form star-shaped cysts (genotypes T7, T8, T9, and T17): characterization of seven new Brazilian environmental isolates and phylogenetic inferences. *Parasitology* 2011;139(1):45–52.
24. Khan NA, Jarroll EL, Paget TA. Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. *Curr Microbiol.* 2002;45(3):197–202.
25. 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.* 2000;66(10):4408–13.
26. 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.* 2000;38(11):3932–6.
27. Mitro K, Bhagavathiammai A, Zhou OM, Bobbett G, McKerrow JH, Chokshi R, Chokshi B, James ER. Partial characterization of the proteolytic secretions of *Acanthamoeba polyphaga*. *Exp Parasitol.* 1994;78(4):377–385.
  28. Leher H, Silvany R, Alizadeh H, Huang J, Niederkorn JY. Mannose induces the release of cytopathic factors from *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun.* 1998; 66(1): 5–10.
  29. Khan NA. Pathogenicity, morphology, and differentiation of *Acanthamoeba*. *Cur Microbiol.* 2001;43(6):391–5.
  30. Siddiqui R, Emes R, Elsheikha H, Khan NA. Area 51: How do *Acanthamoeba* invade the central nervous system? *Trends Parasitol.* 2011;27(5):185–9.
  31. Sissons J, Alsam S, Jayasekera S, Kim KS, Stins M, Khan NA. *Acanthamoeba* induces cell cycle arrest in host cells. *J Med Microbiol.* 2004;53(8):711–7.
  32. Alizadeh H, Pidherney MS, McCulley JP, Niederkorn JY. Apoptosis as a mechanism of cytolysis of tumor cells by a pathogenic free-living amoeba. *Infect Immun.* 1994;62(4):198–303.
  33. Paterson GN, Rittig M, Siddiqui R, Khan NA. Is *Acanthamoeba* pathogenicity associated with intracellular bacteria? *Exp Parasitol.* 2011;129(2):207–10.
  34. Kingston D, Warhust DC. Isolation of amoebae from the air. *J Med Microbiol.* 1969;2(1):27–36.
  35. Rodriguez-Zaragoza S, Rivera F, Bonilla F, Ramirez E, Gallegos E, Calderon A, Ortiz R, Hernandez D. Amoebological study of the atmosphere of San Luis Potosi, SLP, Mexico. *J Expo Anal Environ Epidemiol.* 1993;3(suppl 1):229–41.
  36. Brown TJ, Cursons RTM, Keys EA. Amoebae from Antarctic soil and water. *Appl Environ Microbiol.* 1982;44(2):491–3.

37. Scaglia M, Gatti 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;10(2):171–82.
38. Rivera F, Lares F, Gallegos E, Ramirez E, Bonilla P, Calderon A, Martinez JJ, Rodriguez S, Alcocer J. Pathogenic amoebae in natural thermal waters of three resorts of Hidalgo, Mexico. *Environ Res*. 1989;50(2):289–95.
39. Gianinazzi C, Schild M, Wüthrich F, Müller N, Schürch N, Gottstein B. Potentially human pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a heated indoor swimming pool in Switzerland. *Exp Parasitol*. 2009;121(2):180–6.
40. Michel R, Menn T. *Acanthamoeba*, *Naegleria* and invertebrates in wet areas of physiotherapy equipment in hospitals. *Zentralbl Hyg Umweltmed*. 1991;191(4):423–37.
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;64(5):1822–4.
42. Foronda AS, Bazito Filho O, Rocha AA, Branco SM. Aspectos ecológicos de amebas de vida livre em piscinas de São Paulo. *Resumos da I Reunião da Sociedade Brasileira de Protozoologia*; 1985. Caxambu, MG, Brasil; 1985.
43. Caumo K, Frasson AP, Pens CJ, Panatieri LF, Frazzon APG, Rott MB. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. *Ann Trop Med Parasitol*. 2009;103(6):477–85.
44. Caumo K, Rott MB. *Acanthamoeba* T3, T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. *Acta Trop*. 2011;117(3):233–5.
45. Giuzzi JF, Buainain A, Rosa JA, Martini AS, Belda Neto FM, Martinez I, Fernandes MZT, Barbosa AS, Leandro SM. Free-living amebas isolation in recreation sand tanks for children in Araraquara city. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.

- 1995;90(supl. 1):243, PZ-004. [acesso em 2012 Jan 12. Disponível em: [http://memorias.ioc.fiocruz.br/pdf/Volume90/vol90%28fsup%29\\_242-302.pdf](http://memorias.ioc.fiocruz.br/pdf/Volume90/vol90%28fsup%29_242-302.pdf)
46. Costa AO, Castro EA, Ferreira GA, Furst C, Crozeta MA, Thomaz-Soccol V. Characterization of *Acanthamoeba* isolates from dust of a public hospital in Curitiba, Paraná, Brazil. *J Eukaryot Microbiol.* 2010;57(1):70–5.
  47. Carlesso AM, Artuso GL, Caumo K, Rott MB. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. *Curr Microbiol.* 2010;60(3):185–90.
  48. De Jonckheere JF. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol.* 1980;39(4):681–5.
  49. Magliano AC, Silva FM, Teixeira MM, Alfieri SC. Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. isolated from tap water in Brazil. *Exp Parasitol.* 2009;123(3):231–5.
  50. Rocha-Azevedo B, Menezes GC, Silva-Filho FC. The interaction between *Acanthamoeba polyphaga* and human osteoblastic cells *in vitro*. *Microb Pathog.* 2006;40(1): 8–14.
  51. Khan NA, Tareen NK. Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and pathogenicity-based categorisation of *Acanthamoeba* strains. *Folia Parasitol.* 2003;50(2):97–104.
  52. Rocha-Azevedo B, Silva-Filho FC. Biological characterization of a clinical and an environmental isolate of *Acanthamoeba polyphaga*: analysis of relevant parameters to decode pathogenicity. *Arch Microbiol.* 2007;188(5):441–9.
  53. Cao Z, Jefferson DM, Panjwani N. Role of carbohydrate-mediated adherence in cytopathogenic mechanisms of *Acanthamoeba*. *J Biol Chem.* 1998;273(25):15838–45.

54. Khan NA, Jarrol E, Panjwani N, Cao Z, Paget TA. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. *J Clin Microbiol.* 2000;38(8):2858–61.
55. Maghsood AH, Sissons J, Rezaian M, Nolder D, Warhurst D, Khan NA. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *J Med Microbiol.* 2005;54(8):755–9.
56. Pettit DA, Williamson J, Cabral GA, Marciano-Cabral F. *In vitro* destruction of nerve cell cultures by *Acanthamoeba* spp.: a transmission and scanning electron microscopy study. *J Parasitol.* 1996;82(5):769–77.
57. Marciano-Cabral F, Raborn ES, Martin BR, Cabral GA. Delta-9-tetrahydrocannabinol, the major psychoactive component in marijuana, inhibits macrophage chemotaxis to *Acanthamoeba*. *J Eukaryot Microbiol.* 2006;53(suppl. 1):S15–7.
58. Carlesso AM, Artuso GL, Caumo K, Rott MB. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. *Cur Microbiol.* 2009; 60(3):185–90.
59. Kilic A, Tanyuksel M, Sissons J, Jayasekera S, Khan NA. Isolation of *Acanthamoeba* isolates belonging to T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental samples in Ankara, Turkey. *Acta Parasitol.* 2004;49(3):246–52.
60. Lorenzo-Morales J, Ortega-Rivas A, Foronda P, Martínez E, Valladares B. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitol Res.* 2005;95(4):273–7.
61. Winck MAT, Caumo K, Rott MB. Prevalence of *Acanthamoeba* from tap water in Rio Grande do Sul, Brazil. *Curr Microbiol.* 2011;63(5):464–9.
62. He YG, McCulley JP, Alizadeh H, Pidherney M, Mellon J, Ubelaker JE, Stewart GL, Silvano RE, Niederkorn JY. A pig model of *Acanthamoeba* keratitis: transmission via contaminated contact lenses. *Inv Ophthalmol Vis Sci.* 1992;33(1):126–33.

63. Clarke DW, Alizadeh H, Niederkorn JY. Failure of *Acanthamoeba castellanii* to produce intraocular infections. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(7):2472–8.
64. van Klink F, Taylor WM, Alizadeh H, Jager MJ, van Rooijen N, Niederkorn JY. The role of macrophages in *Acanthamoeba* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37(7):1271–81.
65. Hurt M, Neelam S, Niederkorn J, Alizadeh H. Pathogenic *Acanthamoeba* spp. secrete a mannose-induced cytolytic protein that correlates with the ability to cause disease. *Infect and Immun.* 2003;71(11):6243–55.
66. Culbertson, CG, Smith JW, Cohen HK, Minner JR. Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Am J Pathol.* 1959;35(1):185–97.
67. Im KI, Shin HJ, Seo DW, Jeon SH, Kim TE. Pathogenicity of Korean isolates of *Acanthamoeba* by observing the experimental infection and zymodemes of five isoenzymes. *Kor J Parasitol.* 1999;37(2):85–92.
68. Penas-Ares M, Paniagua-Crespo E, Madriñan-Choren R, Marti-Mallen M, Arias-Fernandez MC. Isolation of free-living pathogenic amoebae from thermal spas in N.W. Spain. *Water Air Soil Pollut.* 1994;78(1–2):83–90.
69. Górnik K, Kuźna-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.
70. Ramirez E, Campoy E, Matuz D, Robles E. *Acanthamoeba* isolated from contaminated groundwater. *J Eukaryot Microbiol.* 2006;53(1):10–1.
71. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;50(1):1–26.
72. Omaña-Molina M, Navarro-García F, González-Robles A, Serrano-Luna JJ, Campos-Rodríguez R, Martínez-Palomo A, Tsutsumi V, Shibayama M. Induction of morphological and electrophysiological changes in hamster cornea after *in*

- in vitro* interaction with trophozoites of *Acanthamoeba* spp. Infect Immun. 2004;72(6):3245–51.
73. Flores BM, Garcia CA, Stamm WE, Torian BE. Differentiation of *Naegleria fowleri* from *Acanthamoeba* species by using monoclonal antibodies and flow cytometry. J Clin Microbiol. 1990;28(9):1999–2005.
74. Gautom RK, Lory S, Seyedirashti S, Bergeron DL, Fritsche TR. Mitochondrial DNA fingerprinting of *Acanthamoeba* spp. isolated from clinical and environmental sources. J Clin Microbiol. 1994;32(4):1070–3.
75. Yu HS, Hwang MY, Kim TO, Yun HC, Kim TH, Kong HH, Chung DI. Phylogenetic relationships among *Acanthamoeba* spp. based on PCR-RFLP analyses of mitochondrial small subunit rRNA gene. Korean J Parasitol. 1999;37(3):181–8.
76. Kubicka U, Olszewski WL, Tarnowski W, Bielecki K, Ziółkowska A, Wierzbicki Z. Normal human immune peritoneal cells: subpopulations and functional characteristics. Scand J Immunol. 1996;44(2):157–63.
77. Gordon S. Pattern recognition receptors. Cell. 2002;111(7):927–30.
78. Stewart GL, Kim I, Shupe K, Alizadeh H, Silvany R, McCulley JP, Niederkorn JY. Chemotactic response of macrophages to *Acanthamoeba castellanii* antigen and antibody-dependent macrophage-mediated killing of the parasite. J Parasitol. 1992;78(5):849–55.
79. Marciano-Cabral F, Toney DM. The interaction of *Acanthamoeba* spp. with activated macrophages and with macrophage cell lines. J Eukaryot Microbiol. 1998;45(4):452–8.
80. Neff RJ, Ray SA, Benton WF, Wilborn M. Induction of synchronous encystment differentiation in *Acanthamoeba* sp. In: Prescott DM, editor. Methods in cell physiology. New York: Academic Press; 1964. v. 1. p. 55–83.
81. Liu H, Ha YR, Lee ST, Hong YC, Kong HH, Chung DI. Genetic diversity of *Acanthamoeba* isolates from ocean sediments. Korean J Parasitol. 2006;44(2):117–25.

82. Tsvetkova N, Schild M, Panaiotov S, Kurdova-Mintcheva R, Gottstein B, Walochnik J, Aspöck H, Lucas MS, Müller N. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol Res.* 2004;92():405–13.
83. Rivera F, Ramírez E, Bonilla P, Calderón A, Gallegos E, Rodríguez S, Ortiz R, Zaldívar B, Ramírez P, Durán A. Pathogenic and free-living amoebae isolated from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. *Environ Res.* 1993;62(1):43–52.
84. Cerva L. Experimental infection of laboratory animals by the pathogenic *Naegleria gruberi* strain Vitek. *Folia Parasitol.* 1971;18(2):171–6.
85. Muniz-Junqueira MI, Prata A, Tosta CE. Factors influencing phagocytosis of *Salmonella typhimurium* by macrophages in murine schistosomiasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1997;30(2):101–6.
86. Kong HH. Molecular phylogeny of *Acanthamoeba*. *Korean J. Parasitol.* 2009;47(suppl.):S21–8.
87. Booton GC, Visvesvara GS, Byers TJ, Kelly DJ, Fuerst PA. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *J Clin Microbiol.* 2005;43(4):1689–93.
88. De Jonckheere JF, Michel R. Species identification and virulence of *Acanthamoeba* strains from human nasal mucosa. *Parasitol Res.* 1988;74(4):314–6.
89. Ledee DR, Iovieno A, Miller D, Mandal N, Diaz M, Fell J, Fini ME, Alfonso EC. Molecular identification of T4 and T5 genotypes in isolates from *Acanthamoeba* keratitis patients. *J Clin Microbiol.* 2009;47(5):1458–62.
90. Niyayati M, Lorenzo-Morales J, Rezaie S, Rahimi F, Mohebbali M, Maghsood AH, Motevall-Haghi A, Martín-Navarro CM, Farnia S, Valladares B, Rezaeian M. Genotyping of *Acanthamoeba* isolates from clinical and environmental specimens in Iran. *Exp Parasitol.* 2009;121(3):242–5.

91. Yera H, Zamfir O, Bourcier T, Ancelle T, Batellier L, Dupouy-Camet J, Chaumeil C. Comparison of PCR, microscopic examination and culture for the early diagnosis and characterization of *Acanthamoeba* isolates from ocular infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007;26(3):221–4.
92. Maritschnegg P, Sovinz P, Lackner H, Benesch M, Nebl A, Schwinger W, Walochnik J, Urban C. Granulomatous amebic encephalitis in a child with acute lymphoblastic leukemia successfully treated with multimodal antimicrobial therapy and hyperbaric oxygen. *J Clin Microbiol*. 2011;49(1):446–8.
93. Alves JMP, Gusmão CX, Teixeira MMG, Freitas D, Foronda AS, Affonso HT. Random amplified polymorphic DNA profiles as a tool for the characterization of Brazilian keratitis isolates of the genus *Acanthamoeba*. *Braz J Med Biol Res*. 2000;33(1):19–26.
94. Walochnik J, Aichelburg A, Assadian O, Steuer A, Visvesvara G, Vetter N, Aspöck H. Granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* amoebae of genotype T2 in a human immunodeficiency virus-negative patient. *J Clin Microbiol*. 2008;46(1):338–40.
95. Blaschitz M, Köhsler M, Aspöck H, Walochnik J. Detection of a serine proteinase gene in *Acanthamoeba* genotype T6 (Amoebozoa: Lobosea). *Exp Parasitol*. 2006;114(1):26–33.
96. Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17( 2):413–33.
97. Machado PRL, Araújo MIAS, Carvalho L, Carvalho EM. Mecanismos de resposta imune às infecções. *An Bras Dermatol*. 2004;79(6):647–62.
98. Siddiqui R, Khan N. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites Vectors*. 2012;5(6):1–13.
99. Khan NA. *Acanthamoeba* invasion of the central nervous system. *Int J Parasitol*. 2007;37(2):131–8.

**ANEXOS**

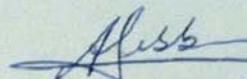
## ANEXO 1 – Documento de Aprovação pelo Comitê de Ética

**Universidade de Brasília**Instituto de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 5 de julho de 2010.

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado **“Avanços no Isolamento e Caracterização Biológica de Acanthamoeba Spp. (Acanthamoebidae) – Ameba de Vida Livre: determinação experimental do potencial patogênico”**, UnBDOC nº. 43036/2010, sob responsabilidade do Prof. Dr. César Augusto Cuba Cuba, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

  
Prof. Antonio Sebben  
Coordenador do CEUA



## ANEXO 2 – Aceite do artigo para publicação no periódico *Experimental Parasitology*

From: EP (ELS) <ep@elsevier.com>  
Date: 2012/1/17  
Subject: EP-11-189R1: Minor Revisions  
To: alveslm@gmail.com

Ms. No.: EP-11-189R1

Title: Occurrence and characterization of *Acanthamoeba* genotypes T4, T5, and T2/T6 isolated from environmental sources in Brasília, Federal District, Brazil

Corresponding Author: Msc Daniella Sousa Mendes Moreira Alves  
Authors: Rodrigo G Gonçalves, PhD; Cesar A Cuba Cuba, PhD; Aline S Moraes, Graduated; Nadjar Nitz, PhD; Mayara C Oliveira, Undergraduate student; Mariana M Hecht, PhD

Dear Msc Alves,

Thank you for submitting your manuscript to *Experimental Parasitology*. I have read over your manuscript and feel that it is acceptable for publication with a few minor revisions.

Please submit your revision online within 90 days by logging onto the Elsevier Editorial System for *Experimental Parasitology*:

<http://ees.elsevier.com/ep/>

Your username is: daniellaalves

If you cannot remember your password, please click the "Send Username/Password" link on the login page.

You can find the manuscript record listed under "Submissions Needing Revisions." Click "Revise" when you are ready to submit your revision.

When submitting your revised paper, please a separate document uploaded as "Response to Reviews" that carefully addresses the issues raised in the below comments, point by point. You should also include a suitable rebuttal to any specific request for change that you have not made.

To facilitate the electronic publication of your manuscript (should it be accepted), we request that your manuscript text, tables and figure legend be submitted in an editable format (Word, WordPerfect, or LaTeX only), and all figures uploaded individually as TIF or EPS files.

Thank you, and we look forward to receiving your revised manuscript.

With kind regards,

Bernd Kalinna  
Deputy Editor  
*Experimental Parasitology*

Reviewers' comments:

Reviewer #1: The authors have made a great progress and the revisited manuscript is suitable for publication after minor revisions according to the following 2 comments.

1) Thermotolerance assays - The authors declare isolation, growth and maintenance of cultures at 25°C on 1.5% non-nutrient agar with *E. coli* (Section 2.2). This fact is not consistent with the results of thermotolerance assays. It is shown in Table 1, that more than 50% of isolates (12 isolates) do not grow at 25°C and 3 isolates do not grow at any temperature.

2) Molecular identification - the classification of isolates into genotypes T4, T5, T2/T6 using only pair wise alignment is not state of the art. The authors have sufficient experimental results to carry out a phylogenetic analysis, which could possibly solve the problem of genotyping of isolates UNB13, A9, A13, and A16. Without phylogenetic analysis it can be only claimed in the title, abstract, and text that the *Acanthamoeba* isolates are "similar" to genotypes T4, T5, and T2/T6.

## APÊNDICE

**APÊNDICE 1 – Artigo aceito para publicação no periódico *Experimental Parasitology***

**Occurrence and characterization of *Acanthamoeba* similar to genotypes T4, T5, and T2/T6 isolated from environmental sources in Brasília, Federal District, Brazil**

Daniella de Sousa Mendes Moreira Alves <sup>a\*</sup>, Aline Silva Moraes <sup>a</sup>, Nadjar Nitz <sup>b</sup>, Mayara Gabriele Carvalho de Oliveira <sup>a</sup>, Mariana Machado Hecht <sup>b</sup>, Rodrigo Gurgel-Gonçalves <sup>a</sup>, César Augusto Cuba Cuba<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> *Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900 Brasília, DF, Brazil*

<sup>b</sup> *Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900 Brasília, DF, Brazil*

<sup>c</sup> *Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri, 39100-000, Diamantina, MG, Brazil*

\*Corresponding author. Address: Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900 Brasília, DF, Brazil.

Tel.: +55 61 3107-1786

Fax: +55 61 3273-3907

E-mail: alveslm@gmail.com

Research partially funded by CNPq.

## ABSTRACT

Species of *Acanthamoeba* can cause keratitis and brain infections. The characterization of environmental isolates is necessary to analyze the risk of human infection. We aimed at identifying and genotyping *Acanthamoeba* isolates from soil, swimming pools, and water features in Brasília, Federal District, Brazil, as well as determining their physiological characteristics and pathogenic potential. Among the 18 isolates studied, eight were similar to genotype T5, five to T4, and one to T2/T6, classified by the sequence analysis of 18S rDNA. Genotypes of four isolates were not determined. Ten isolates (55%) grew at 37°C and seven (39%) grew in media with 1.5 M mannitol, which are the physiological parameters associated with pathogenic *Acanthamoeba*; also, four isolates from swimming pools presented high pathogenic potential. Our results indicate a widespread distribution of potentially pathogenic *Acanthamoeba* T4, T5, and T2/T6 in different environmental sources in Brasília, revealing the potential risk of human infection and the need of preventive measures.

*Keywords:* *Acanthamoeba*; soil; swimming pool; water feature; genotypes.

## 1. Introduction

Free-living amoebae (FLA) are ubiquitous and sometimes opportunistic protozoans found in humid soil, aquatic habitats, and atmosphere. *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, and *Sappinia* are the genera that include species of greatest public health importance (Visvesvara et al., 2007). FLA are thermotolerant, resistant to extreme temperature and pH conditions, as well as to chlorine and other disinfection media. Most environmental studies on the subject have focused on pathogenic FLA species, taxonomic and pathogenic markers, geographic distribution, ecology and transmission dynamics. Some species of *Acanthamoeba* can cause keratitis (generally associated with the use of contact lenses) or brain infections (exclusively in immunocompromised people), conditions that have great impact on human health (Khan, 2006; Marciano-Cabral and Cabral 2003; Pens et al., 2008).

Page (1976) classified many species of FLA from soil and water using keys related to morphological aspects. Afterwards, Pussard and Pons (1977) created three groups of species belonging to *Acanthamoeba* genus based on cyst morphology and size. Nowadays, polymerase chain reaction (PCR) and sequence analysis are used to identify *Acanthamoeba* species and their genotypes (Booton et al., 2005; Caumo et al., 2009; Caumo and Rott, 2011; Gianinazzi et al., 2009; Khan, 2006; Khan et al., 2001; Magliano et al., 2009; Rocha-Azevedo and Silva-Filho, 2007; Schroeder et al., 2001; Visvesvara et al., 2010). The genus *Acanthamoeba* has been currently classified into 17 different genotypes, T1 to T17, based on 18S r-RNA nucleotide sequencing (Corsaro and Venditti, 2010; Nuprasert et al., 2010).

Brazilian studies on FLA have provided information on their isolation, morphology, physiology, genetics, and pathogenicity. Moreover, the list of environmental and clinical isolates of *Acanthamoeba* continues growing in Brazil (Carlesso et al., 2010; Caumo and Rott, 2011; Costa et al., 2010; Magliano et al., 2009; Magliano et al., 2012; Silva and Rosa, 2003; Teixeira et al., 2009; Winck et al., 2011). Therefore, the identification and biological characterization of environmental isolates are fundamental to properly assess the risk of human infection caused by *Acanthamoeba*. Thus, in this study, we aimed at identifying and genotyping *Acanthamoeba* isolates from soil, swimming pools, and water features in Brasília,

Federal District, Brazil, as well as determining their physiological characteristics and pathogenic potential.

## 2. Material and methods

### 2.1. Samples

A total of 18 samples, collected between 2005 and 2011, from different environmental sources (soil, swimming pools, and water features) and belonging to the FLA collection of the Laboratory of Parasitology at the Universidade de Brasília (UnB) were chosen for this study. The reference strain *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC 30461), used as positive control, was maintained without shaking in YAS medium [0.1 g yeast extract (Himedia, HiMedia Laboratories Pvt Ltd., Mumbai, India) in 1000 mL Page's amoeba saline] at 30°C and non-nutrient agar (MERSE, São Paulo, SP, Brazil) covered with NA22 *Escherichia coli* inactivated by heat (Tsvetkova et al., 2004).

### 2.2. Isolation and growth of *Acanthamoeba*

Soil samples (UnB11 and UnB13) were directly taken from one of the gardens of the UnB, by scraping the soil with the edge of a dry sterilized microscope slide. The samples were placed in the middle of a plate containing non-nutrient agar covered with *E. coli* inactivated by heat, sealed with Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA), incubated at 25°C, and observed daily to evaluate *Acanthamoeba* growth.

The soil samples were maintained in the laboratory by periodically (48-h intervals) cutting out a small piece of agar containing trophozoites and cysts and transplanting it onto a fresh agar plate coated with bacteria (Visvesvara et al., 2007).

Water samples (500 mL) were collected from public swimming pools in the Federal District (UnB3, IP1S1, P3, P4, P6, P7, P9) and from water features of

governmental buildings in Brasília (A1, A3, A4, A6, A8, A9, A10, A13, A16) directly in flasks which were immediately sealed. We also collected samples of these sources rubbing sterile cotton swabs on the walls of swimming pools and water features and placing them individually into test tubes, containing 10 mL solution of sterile saline and distilled water, which were immediately sealed. Under aseptic conditions, in a laminar air flow hood, the samples were transferred to cups of sedimentation. After 24 h, 1 mL of each sample sediment was transferred to plates containing 1.5% non-nutrient agar in duplicates, covered by an overlay of inactivated *E. coli*, sealed, incubated at 25°C, and observed daily to evaluate *Acanthamoeba* growth. These cultures were maintained as described for the soil samples.

Following isolation, *Acanthamoeba* isolates grew axenically as previously described by Khan et al. (2001). Briefly, non-nutrient agar containing *Acanthamoeba* cysts was inoculated on non-nutrient agar plates seeded with *E. coli*. Once the cysts transformed into trophozoites, the plates were washed with sterile saline solution, the cell pellet was centrifuged (252x *g* for 15 min), and the supernatant was discarded for three consecutive times. The sediment was inoculated into YAS medium and incubated at 30°C.

### 2.3. Morphological characterization

Cysts were harvested from culture plates by washing them with sterile saline solution (2 mL) in a laminar air flow hood and prepared for observation between a slide and a cover slip in a light optical microscope (DMLB, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Germany), at 1000x magnification.

The morphological characteristics of the trophozoites and cysts were analyzed following the descriptions given by Page (1976). We measured 100 cysts using an ocular micrometer scale under a light optical microscope. *Acanthamoeba* isolates were classified according to the three known groups (I, II, and III) based on cyst size and shape (Khan, 2006; Pussard and Pons, 1977; Visvesvara et al., 2007).

## 2.4. Tolerance assays

The tolerance assays were performed in triplicate for each isolate with *A. polyphaga* (ATCC 30461), which was used as the reference for pathogenic behavior. The diameter of the inoculum was measured at the time of inoculation and the size of the clearing zones, which indicate bacterial consumption in the agar surface, was measured after 120 h. The presence and absence of a clear zone in each plate were scored as positive (+) and negative (–), respectively (Winck et al., 2011).

### 2.4.1. Osmotolerance

In order to investigate the effect of osmolarity on the growth of *Acanthamoeba* trophozoites of each isolate, plates containing non-nutrient agar incorporated with 0.5 M, 1.0 M, and 1.5 M mannitol (Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brazil) or without the saccharide (negative control) were previously covered with living *E. coli* and incubated at 37°C for 24 h to allow bacteria growth (Khan et al., 2001). Then,  $10^3$  trophozoites cultured in YAS medium were inoculated in the plates described above, incubated at 30°C for 120 h, and their growth was evaluated.

### 2.4.2. Thermotolerance

We prepared plates with non-nutrient agar covered with living *E. coli* previously incubated at 37°C for 24 h to allow bacterial growth (Khan et al., 2001). After that,  $10^3$  trophozoites taken from the isolates cultured in YAS medium were inoculated on the plates and incubated at 30°C and 37°C for 120 h. The growth of isolates of the genus *Acanthamoeba* at high temperature as a parameter of pathogenicity was assessed at the end of these incubation periods as described for the osmotolerance assay.

## 2.5. Molecular identification of *Acanthamoeba* isolates

Total DNA was extracted from each isolate (containing  $10^4$  trophozoites) using DNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), following the manufacturer's protocol.

DNA was subjected to PCR aiming at the specific recognition of 18S rDNA from amoeba of the genus *Acanthamoeba* using the primers JDP1 (5'-GGC CCA GAT CGT TTA CCG TGA A-3') and JDP2 (5'-TCT CAC AAG CTG CTA GGG GAG TCA-3'), described by Schroeder et al. (2001). Amplifications were carried out in a 50  $\mu$ L volume containing 20–50 ng DNA, 0.2 mM dNTPs mix (GE Healthcare, Buckinghamshire, England UK), 0.4  $\mu$ M of each oligonucleotide, reaction buffer (50 mM  $KCl_2$ , 10 mM Tris-HCl), 1.5 mM magnesium chloride, and 2 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A DNA thermal cycler (My Cycler Bio-Rad, Foster City, CA, USA) was used for 30 cycles as follows: 94°C for 1 min, 67°C for 1 min, 72°C for 1 min, and 72°C for 5 min. In control experiments, each PCR was conducted with a template DNA-free blank and DNA from a reference strain *A. polyphaga* (ATCC 30461). An aliquot of 10  $\mu$ L from each PCR reaction was subjected to a 1% agarose gel electrophoresis, stained with 0.1  $\mu$ M/mL ethidium bromide, and observed under a UV-light transilluminator. A 1 kb ladder plus (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used as a DNA size marker. Subsequently, the PCR product was purified using the GFX kit Illustra<sup>®</sup> DNA and PCR<sup>®</sup> Gel Band (GE Healthcare Buckinghamshire, England, UK).

For DNA sequencing, 1  $\mu$ L of PCR (60–100 ng) purified product was sequenced using a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems kit, Foster City, CA, USA), employing the same PCR primers, at Genomic (São Paulo, SP, Brazil).

The nuclear 18S rDNA sequences of environmental isolates were compared with sequences of different *Acanthamoeba* species published (GenBank), using the Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) program of the US National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), to search for the most similar sequences in order to classify our *Acanthamoeba* isolates into the different genotypes. The 18S rRNA gene sequences of the 18 *Acanthamoeba* isolates determined in this study were deposited in the GenBank database (JF960525 and JQ268232 to JQ268248).

## 2.6. Statistical analysis

Variations in the diameter of the cysts and growth at different osmolarities and temperatures among isolates were analyzed using the Kruskal-Wallis H test ( $\alpha = 0.01$ ), performed with Statistica 6.0 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

## 3. Results

### 3.1. Morphological characterization

Morphological characterization of isolates revealed *Acanthamoeba* cyst structures such as nuclei, ectocyst (external cyst wall), endocyst, and arm extensions (internal cyst wall). Also, trophozoites showed numerous acanthopodia, slow poly-directional movement, and vacuole forming. The mean diameter of the cysts ranged from 10.6  $\mu\text{m}$  to 16.4  $\mu\text{m}$  (Table 1) and we scored statistically significant differences among the 18 isolates (Kruskal-Wallis  $H_{17, 1800} = 554.6$ ;  $P < 0.01$ ). We detected wrinkled endocysts in nine isolates (UnB11, UnB13 – soil; UnB3, IP1S1, P4 – swimming pools; A3, A6, A13, A16 – water features) that were therefore classified in group II. As the other nine isolates (P3, P6, P7, P9 – swimming pools; A1, A4, A8, A9, A10 – water features) showed round endocysts, they were classified in group III.

### 3.2. Osmolarity and temperature tolerance assays

Among the 18 isolates analyzed, 55% grew at high temperature (37°C) and 39% at high osmolarity (1.5 M mannitol); five isolates collected from swimming pools, four from water features, and one from soil grew at the highest temperature; five isolates collected from swimming pools, one from water feature, and one from soil grew at the highest osmolarity; four isolates collected from swimming pools (UnB3, IP1S1, P6, P7) presented osmo and thermotolerance.

**Table 1**

Genotypic, morphometric, and physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates from different sources in Brasília, Federal District, Brazil.

Isolate	Source <sup>a</sup>	GenBank accession no.	Genotype	Reference sequence <sup>b</sup>		Cyst diameter ( $\mu\text{m}$ ; mean $\pm$ SD) <sup>c</sup>	Tolerance assays <sup>d</sup>				
				GenBank accession no.	Identity (%)		Osmotolerance (M mannitol)			Thermotolerance ( $^{\circ}\text{C}$ )	
							0.5	1.0	1.5	30	37
UNB11	S	JF960525	T4	DQ087298	99	11.0 $\pm$ 1.6	–	–	–	+	+
UNB13	S	JQ268234	ND	ND	ND	11.9 $\pm$ 1.4	+	+	+	+	–
UNB 3	SP	JQ268232	T4	EU934064	100	10.6 $\pm$ 1.1	–	+	+	+	+
IP1S1	SP	JQ268233	T4	U07408	99	13.0 $\pm$ 1.6	+	+	+	+	+
P3	SP	JQ268235	T5	AB525818	99	13.0 $\pm$ 3.0	–	+	+	–	–
P4	SP	JQ268236	T4	EF554328	99	13.9 $\pm$ 2.4	–	+	–	+	–
P6	SP	JQ268237	T5	AB525818	99	14.6 $\pm$ 2.3	–	–	+	–	+
P7	SP	JQ268238	T5	AB525832	100	12.7 $\pm$ 2.1	–	–	+	–	+
P9	SP	JQ268239	T5	AB525818	95	11.3 $\pm$ 2.0	+	–	–	–	+
A1	WF	JQ268240	T5	AB525832	97	11.2 $\pm$ 2.2	–	–	–	–	–
A3	WF	JQ268241	T2/T6	AY026244	97	11.0 $\pm$ 2.0	–	–	–	–	–

**Table 1**

Genotypic, morphometric, and physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates from different sources in Brasília, Federal District, Brazil.

Isolate	Source <sup>a</sup>	GenBank accession no.	Genotype	Reference sequence <sup>b</sup>		Cyst diameter ( $\mu\text{m}$ ; mean $\pm$ SD) <sup>c</sup>	Tolerance assays <sup>d</sup>				
				GenBank accession no.	Identity (%)		Osmotolerance (M mannitol)			Thermotolerance ( $^{\circ}\text{C}$ )	
							0.5	1.0	1.5	30	37
A4	WF	JQ268242	T5	AB525818	99	12.7 $\pm$ 2.4	+	+	+	+	-
A6	WF	JQ268243	T4	HQ450394	99	11.0 $\pm$ 1.7	-	-	-	-	-
A8	WF	JQ268244	T5	AB525818	99	11.3 $\pm$ 1.7	-	-	-	-	+
A9	WF	JQ268245	ND	ND	ND	11.1 $\pm$ 2.0	-	-	-	+	-
A10	WF	JQ268246	T5	AB525832	97	16.4 $\pm$ 3.5	-	-	-	+	+
A13	WF	JQ268247	T4	ND	ND	11.2 $\pm$ 2.0	+	-	-	+	+
A16	WF	JQ268248	T5	ND	ND	13.8 $\pm$ 2.5	+	-	-	-	+
ATCC <sup>e</sup>	K	AY026243	T4	AY026243	100	15.7 $\pm$ 3.0	+	+	-	-	+

<sup>a</sup> S: soil; SP: swimming pool; WF: water feature; K: keratitis.

<sup>b</sup> Percentage of identity and access number comparing the sequences of isolates of this study to GenBank; ND: genus *Acanthamoeba*, but genotype not determined.

<sup>c</sup> 100 cysts measured.

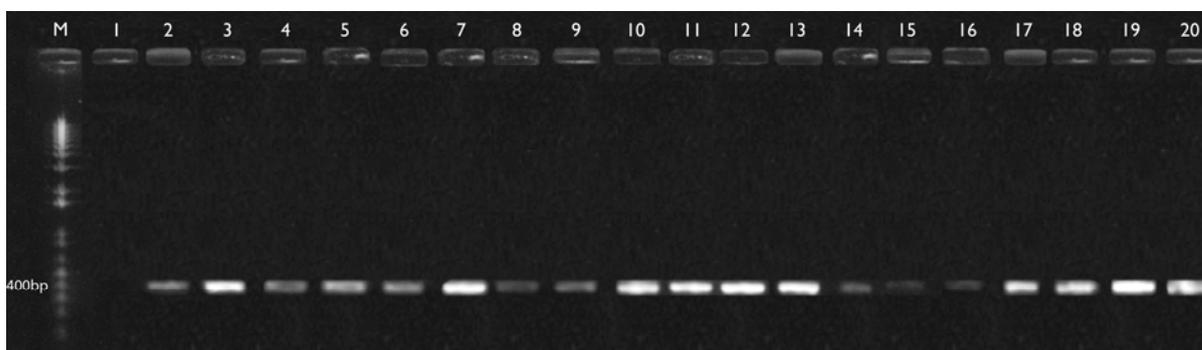
<sup>d</sup> +: presence of a clear zone; -: absence of a clear zone (see Material and methods).

<sup>e</sup> ATCC: *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30461.

A significant difference was observed regarding the size of the growth ring of the isolates incubated at 1.5 M mannitol (Kruskal-Wallis  $H_{17, 54} = 46.2$ ,  $P < 0.01$ ) and at 37°C (Kruskal-Wallis  $H_{17, 55} = 45.5$ ;  $P < 0.01$ ). At 1.5 M mannitol, isolates UnB13 (soil) and IP1S1 (swimming pool) presented the highest growth, whereas at 37°C, isolates A10 (water feature), IP1S1, and UnB3 (swimming pool) exhibited the highest growth rate (Table 1).

### 3.3. Molecular identification

PCR analyses of the samples were performed at different times to amplify ASA.S1 (approximately 400 bp) from environmental isolates and ATCC 30461. Only the positive ones, with their respective bands, were selected and grouped into a single picture to allow comparative assessment (Fig. 1).



**Fig. 1.** PCR analysis of different *Acanthamoeba* environmental isolates collected in Brasília, Federal District, Brazil. M: molecular size marker (1kb ladder plus); 1: negative control; 2: reference strain *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC 30461); 3: UnB11 (soil); 4: UnB13 (soil); 5: UnB3 (swimming pool); 6: IP1S1 (swimming pool); 7: P3 (swimming pool); 8: P4 (swimming pool); 9: P6 (swimming pool); 10: P7 (swimming pool); 11: P9 (swimming pool); 12: A1 (water feature); 13: A3 (water feature); 14: A4 (water feature); 15: A6 (water feature); 16: A8 (water feature); 17: A9 (water feature); 18: A10 (water feature); 19: A13 (water feature); 20: A16 (water feature).

The sequence analyses characterized the new isolates as similar to genotypes T4, T5, and T2/T6. Among the 18 isolates analyzed, eight had correspondence with available sequences of genotype T5, presenting identity ranging from 95% to 100%; five isolates were related to the reference sequences of T4 genotype, with 99% to 100% identity; and one isolate revealed close identity (97%) to T2/T6 lineage; the remaining four isolates only exhibited a sequence pattern corresponding to the genus *Acanthamoeba* (Table 1).

#### 4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study of occurrence of *Acanthamoeba* similar to T4, T5, and T2/T6 genotypes in soil and water samples from Brasília, Federal District, Brazil. The presence of potential pathogenic *Acanthamoeba* in soils, swimming pools, and water features can be explained by the high resistance of cysts to the environmental conditions and disinfection systems used in swimming pools. We encountered stellate and round endocysts and the isolates were characterized, based on cyst features, in groups II and III, respectively, according to the classification created by Pussard and Pons (1977). The species belonging to these groups are morphologically very similar and frequently associated with human infections, especially encephalitis and keratitis (Caumo et al., 2009). Group II also contains *Acanthamoeba* species most commonly isolated from the environment (Kong, 2009; Stothard et al., 1998).

The significant morphological variation in cyst diameter and shape among the 18 isolates studied corroborates the fact that the identification of *Acanthamoeba* species based only on morphological features is problematic, as observed in other studies (Gianinazzi et al., 2009; Khan et al., 2001; Visvesvara et al., 2007). Moreover, as described previously, culture media and *in vitro* procedures can modify the morphology of isolates from the same species (Stothard et al., 1998).

*Acanthamoeba* ability to grow under high osmotic stress and/or high temperatures can be related to virulence, as previously shown (Khan et al., 2001; Khan and Tareen, 2003; Lorenzo-Morales et al., 2005; Winck et al., 2011). We consider that the isolates that grew at 1.5 M mannitol and at 37°C (UnB3, IP1S1, P6,

P7) have pathogenic potential, two similar to genotype T4 (UnB3 and IP1S1) and the other two (P6 and P7) to genotype T5. All these isolates were collected from public swimming pools, representing a risk factor to the population exposed. Regarding the reference strain chosen in our study (the known pathogenic ATCC 30461), no growth was observed at 1.5 M mannitol, what could be expected according to Magliano et al. (2009), who showed the negative effect of this saccharide on trophozoite growth in a concentration-dependent manner. However, ATCC 30461 grew at 1.0 M mannitol, an exclusive behavior and a hallmark of pathogenic strains (Khan et al., 2001; Khan et al., 2002).

All the isolates in this study exhibited morphological features of the genus *Acanthamoeba*, confirmed by means of PCR. Five isolates were characterized as similar to genotype T4 due to their strict correspondence to the reference sequences of this genotype (the identity between the obtained sequences and the ones chosen as reference ranged from 99% to 100%). Accumulating sequence data indicate that the vast majority of environmental, keratitis, and nonkeratitis *Acanthamoeba* isolates belong to genotype T4 (Booton et al., 2005; Khan, 2006; Magliano et al., 2009). Some authors suggest that genotype T4 should be referred to as *A. castellanii* species complex until future higher-resolution analyses enable a more accurate differentiation amongst the morphologically described species within this genotype (Booton et al., 2005; Corsaro and Venditti, 2010; Kong, 2009). In our case, however, isolates similar to genotype T5 was the most prevalent in swimming pools and water features, a fact also observed by Caumo and Rott (2011), who encountered a higher prevalence of T5 among *Acanthamoeba* isolated from water.

Genotype T5 has been detected in human mucosa without amoebic infection and related with better resistance to multipurpose contact lens cleaning solutions when compared with T4. It has also been described in cases of keratitis (Ledee et al., 2009). The exposure of contact lens wearers, as well as people with corneal micro traumas, to swimming pools represents a risk factor for keratitis.

Swimming pool isolate UnB3 showed 99% identity with available T4 sequence EU934064 from an Iranian soil sample, which was reported by Niyiyati et al. (2009) as an important factor in the causation of *Acanthamoeba* keratitis in contact lens wearers. The authors also described a high prevalence of T4 genotype in soil sources.

Soil isolate UnB11, which is similar to genotype T4, showed high homology (99%) with a pathogenic *Acanthamoeba* sp. strain isolated from an ocular infection (GenBank DQ087298) (Yera et al., 2007).

In Austria, a 25-month-old boy living in a rural area presented hemiparesis as a consequence of brain abscesses caused by *Acanthamoeba*, diagnosed using PCR. Further specification revealed *Acanthamoeba* group II, which contains genotype T4, recognized as the predominant type that causes granulomatous amebic encephalitis (GAE) in humans (Maritschnegg et al., 2011).

Pathogenic species of *Acanthamoeba* are able to grow under high osmotic pressure; therefore, mannitol is an inhibitor of non-pathogenic amoebae at high temperatures, such as inside the human body (Khan et al., 2001). In Brazil, Carlesso et al. (2010) observed growth in four out of 10 hospital dust isolates at high osmolarity (1M mannitol) and all their samples grew at 37°C. In Turkey, Kilic et al. (2004) detected growth in 12 out of 18 environmental isolates at high osmolarity and high temperature.

Recently, Magliano et al. (2009) demonstrated high identity of an *Acanthamoeba* isolate from tap water in São Paulo, Brazil, and *A. polyphaga* ATCC 30461. Moreover, isolates of *A. polyphaga* have different morphological and physiological features (growth in PYG medium, cytopathic effect in cultured cells, number of acanthopodia, presence of locomotory structures, plastic adherence, and collagen invasion) as demonstrated by Rocha-Azevedo and Silva-Filho (2007).

*A. polyphaga* was isolated for the first time in Texas (USA) from a patient with keratitis (Visvesvara et al., 2007). Although *A. polyphaga* belongs to the *A. castellanii* complex, the trophozoites had a higher number of acanthopodia than *A. castellanii* in tests of interaction with hamster corneal epithelial cells (Omaña-Molina et al., 2004). Some strains of *A. polyphaga* are also able to destroy corneal epithelial cells after 12 h in culture, as well as human osteoblasts (Khan and Tareen, 2003; Rocha-Azevedo et al., 2006).

Our isolate A3 (water surface) revealed close identity (97%) to the reference strain *A. polyphaga* ATCC 30872, an environmental isolate traditionally classified in genotype T4 (Alves et al., 2000). Corsaro and Venditti (2010) have recently presented genetic and phylogenetic data supporting that *A. polyphaga* ATCC 30872

showed similarities with both T2 and T6 genotypes and proposed to remove the word “*polyphaga*” from its name and reclassify it as a distinct clade within the T2/T6 lineage.

Additionally, strains belonging to T2 genotype have recently been associated with human cases of keratitis and encephalitis (Maghsood et al., 2005; Walochnik et al., 2008). Genotype T6 has been associated with cases of keratitis, including the expression of a serine proteinase gene in a highly pathogenic keratitis isolate (Blaschitz et al., 2006; Visvesvara et al., 2007). Nevertheless, other pathogenicity assays are necessary to assess the pathogenic potential of our isolate A3, since no growth at high temperature and osmolarity was observed.

In conclusion, we found potentially pathogenic *Acanthamoeba* in different environments (soil, swimming pools, and water features) in Brasília, Federal District, Brazil. This result reveals the potential risk of human infection and the need of preventive measures. Experimental infections of *Acanthamoeba* isolated in our study in murine models are necessary to fully determine their pathogenicity in order to evaluate the risks they pose in Brasília, Brazil.

### **Acknowledgements**

The authors are deeply grateful to: Fernando da Costa e Silva-Filho, who kindly sent the ATCC 30461 aliquots to our laboratory; Annette Silva Foronda, who kindly taught us the techniques of isolation and gave us aliquots of NA22 *Escherichia coli*; Antonio Raimundo Lima Cruz Teixeira, who is in charge of the laboratory where great part of the molecular analyses was carried out; Adriano Rios da Silva for his collaboration in the molecular analyses; Elena C. Visciarelli (Universidad Nacional del Sur, Argentina), Eleuza R. Machado (Universidade de Brasília, Brazil), and Silvia C. Alfieri (Universidade de São Paulo, Brazil) for reviewing this manuscript.

### **References**

Alves, J.M.P., Gusmão, C.X., Teixeira, M.M.G., Freitas, D., Foronda, A.S., Affonso, H.T., 2000. Random amplified polymorphic DNA profiles as a tool for the

- characterization of Brazilian keratitis isolates of the genus *Acanthamoeba*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33, 19–26.
- Blaschitz, M., Köhler, M., Aspöck, H., Walochnik, J., 2006. Detection of a serine proteinase gene in *Acanthamoeba* genotype T6 (Amoebozoa: Lobosea). *Exp. Parasitol.* 114, 26–33.
- Booton, G.C., Visvesvara, G.S., Byers, T.J., Kelly, D.J., Fuerst, P.A., 2005. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1689–1693.
- Carlesso, A.M., Artuso, G.L., Caumo, K., Rott, M.B., 2010. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. *Curr. Microbiol.* 60, 185–190.
- Caumo, K., Frasson, A.P., Pens, C.J., Panatieri, L.F., Frazzon, A.P.G., Rott, M.B., 2009. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 103, 477–485.
- Caumo, K., Rott, M.B., 2011. *Acanthamoeba* T3, T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. *Acta Trop.* 117, 233–235.
- Corsaro, D., Venditti, D. 2010. Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitol. Res.* 107, 233–238.
- Costa, A.O., Castro, E.A., Ferreira, G.A., Furst, C., Crozeta, M.A., Thomaz-Soccol, V., 2010. Characterization of *Acanthamoeba* isolates from dust of a public hospital in Curitiba, Paraná, Brazil. *J. Eukaryot. Microbiol.* 57, 70–75.
- Gianinazzi, C., Schild, M., Wüthrich, F., Müller, N., Schürch, N., Gottstein, B., 2009. Potentially human pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a heated indoor swimming pool in Switzerland. *Exp. Parasitol.* 121, 180–186.
- Khan, N.A., 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 564–595.
- Khan, N.A., Jarroll, E.L., Paget, T.A., 2001. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. *Curr. Microbiol.* 43, 204–208.

- Khan, N.A., Jarroll, E.L., Paget, T.A., 2002. Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. *Curr. Microbiol.* 45, 197–202.
- Khan, N.A., Tareen, N.K., 2003. Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and pathogenicity-based categorisation of *Acanthamoeba* strains. *Folia Parasitol.* 50, 97–104.
- Kilic, A., Tanyuksel, M., Sissons, J., Jayasekera, S., Khan, N.A., 2004. Isolation of *Acanthamoeba* isolates belonging to T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental samples in Ankara, Turkey. *Acta Parasitol.* 49, 246–252.
- Kong, H.H., 2009. Molecular phylogeny of *Acanthamoeba*. *Korean J. Parasitol.* 47, S21-S28.
- Ledee, D.R., Iovieno, A., Miller, D., Mandal, N., Diaz, M., Fell, J., Fini, M.E., Alfonso, E.C., 2009. Molecular identification of T4 and T5 genotypes in isolates from *Acanthamoeba keratitis* patients. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1458–1462.
- Lorenzo-Morales, J., Ortega-Rivas, A., Foronda, P., Martínez, E., Valladares, B., 2005. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitol. Res.* 95, 273–277.
- Maghsood, A.H., Sissons, J., Rezaian, M., Nolder, D., Warhurst, D., Khan, N.A., 2005. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *J. Med. Microbiol.* 54, 755–759.
- Magliano, A.C., Silva, F.M., Teixeira, M.M., Alfieri, S.C., 2009. Genotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. isolated from tap water in Brazil. *Exp. Parasitol.* 123, 231–235.
- Magliano, A.C., Teixeira, M.M., Alfieri, S.C., 2012. Revisiting the *Acanthamoeba* species that form star-shaped cysts (genotypes T7, T8, T9, and T17): characterization of seven new Brazilian environmental isolates and phylogenetic inferences. *Parasitology* 139, 45–52.
- Marciano-Cabral, F., Cabral, G., 2003. *Acanthamoeba* spp as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 273–307.

- Maritschnegg, P., Sovinz, P., Lackner, H., Benesch, M., Nebl, A., Schwinger, W., Walochnik, J., Urban, C., 2011. Granulomatous amebic encephalitis in a child with acute lymphoblastic leukemia successfully treated with multimodal antimicrobial therapy and hyperbaric oxygen. *J. Clin. Microbiol.* 49, 446–448.
- Niyyati, M., Lorenzo-Morales, J., Rezaie, S., Rahimi, F., Mohebbali, M., Maghsood, A.H., Motevalli-Haghi, A., Martín-Navarro, C.M., Farnia, S., Valladares, B., Rezaeian, M., 2009. Genotyping of *Acanthamoeba* isolates from clinical and environmental specimens in Iran. *Exp. Parasitol.* 121, 242–245.
- Nuprasert, W., Putaporntip, C., Pariyakanok, L., Jongwutiwes, S., 2010. Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4636–4640.
- Omaña-Molina, M., Navarro-García, F., González-Robles, A., Serrano-Luna, J.J., Campos-Rodríguez, R., Martínez-Palomo, A., Tsutsumi, V., Shibayama, M., 2004. Induction of morphological and electrophysiological changes in hamster cornea after *in vitro* interaction with trophozoites of *Acanthamoeba* spp. *Infect. Immun.* 72, 3245–3251.
- Page, F.C., 1976. An illustrated key to freshwater and soil amoebae with notes on cultivation and ecology. Freshwater Biological Association, Ambleside. (Scientific Publication no. 34).
- Pens, C.J., Costa, M., Fadanelli, C., Caumo, K., Rott, M.B., 2008. *Acanthamoeba* spp. and bacterial contamination in contact lens storage cases and the relationship to user profiles. *Parasitol. Res.* 103, 1241–1245.
- Pussard, M., Pons, R., 1977. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica* 8, 557–598.
- Rocha-Azevedo, B., Menezes, G.C., Silva-Filho, F.C., 2006. The interaction between *Acanthamoeba polyphaga* and human osteoblastic cells *in vitro*. *Microb. Pathog.* 40, 8–14.
- Rocha-Azevedo, B., Silva-Filho, F.C., 2007. Biological characterization of a clinical and an environmental isolate of *Acanthamoeba polyphaga*: analysis of relevant parameters to decode pathogenicity. *Arch. Microbiol.* 188, 441–449.

- Schroeder, J.M., Booton, G.C., Hay, J., Niszl, I.A., Seal, D.V., Markus, M.B., Fuerst, P.A., Byers, T.J., 2001. Use of subgenetic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genes and genotype identification of *Acanthamoebae* from human with keratitis and from sewage sludge. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1903–1911.
- Silva, M.A., Rosa, J.A., 2003. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. *Rev. Saúde Pública* 37, 242–246.
- Stothard, D.R., Schroeder-Diedrich, J.M., Awwad, M.H., Gast, R.J., Ledee, D.R., Rodriguez-Zaragoza, S., Dean, C.L., Fuerst, P.A., Byers T.J., 1998. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J. Eukaryot. Microbiol.* 45, 45–54.
- Teixeira, L.H., Rocha, S., Pinto, R.M.F., Caseiro, M.M., Costa, S.O.P., 2009. Prevalence of potentially pathogenic free-living amoebae from *Acanthamoeba* and *Naegleria* genera in non-hospital, public, internal environments from the city of Santos, Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 13, 395–397.
- Tsvetkova, N., Schild, M., Panaiotov, S., Kurdova-Mintcheva, R., Gottstein, B., Walochnik, J., Aspöck, H., Lucas, M.S., Müller N., 2004. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol. Res.* 92, 405–413.
- Visvesvara, G.S., Moura, H., Schuster, F.L., 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50, 1–26.
- Visvesvara, G.S., Shoff, M.E., Sriram, R., Booton, G.C., Crary, M., Fuerst, P.A., Hanley, C.S., Garner, M.M., 2010. Isolation, morphologic, serologic and molecular identification of *Acanthamoeba* T4 genotype from the liver of a Temminck's tragopan (*Tragopan temminckii*). *Vet. Parasitol.* 170, 197–200.
- Walochnik, J., Aichelburg, A., Assadian, O., Steuer, A., Visvesvara, G., Vetter, N., Aspöck, H., 2008. Granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* amoebae of genotype T2 in a human immunodeficiency virus-negative patient. *J. Clin. Microbiol.* 46, 338–340.
- Winck, M.A.T., Caumo K., Rott M.B., 2011. Prevalence of *Acanthamoeba* from tap water in Rio Grande do Sul, Brazil. *Curr. Microbiol.* 63, 464–469.

Yera, H., Zamfir, O., Bourcier, T., Ancelle, T., Batellier, L., Dupouy-Camet, J., Chaumeil, C., 2007. Comparison of PCR, microscopic examination and culture for the early diagnosis and characterization of *Acanthamoeba* isolates from ocular infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 221–224.