

Débora Borgert Wopereis

**CARACTERIZAÇÃO DE *Acanthamoeba* spp. E
MICROORGANISMOS RESISTENTES ÀS AMEBAS OBTIDOS
DE APARELHOS DE AR CONDICIONADO DE AMBIENTES DE
UM HOSPITAL PÚBLICO DE FLORIANÓPOLIS, SC**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Karin Silva Caumo

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Luiza Bazzo

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Wopereis, Débora Borgert

CARACTERIZAÇÃO DE Acanthamoeba spp. E
MICROORGANISMOS RESISTENTES ÀS AMEBAS OBTIDOS DE
APARELHOS DE AR CONDICIONADO DE AMBIENTES DE UM
HOSPITAL PÚBLICO DE FLORIANÓPOLIS, SC / Débora
Borgert Wopereis ; orientadora, Karin Silva Caumo,
coorientadora, Maria Luiza Bazzo, 2018.

106 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Acanthamoeba spp.. 3.
Microorganismos resistentes às amebas. 4. Ambientes
hospitalares. I. Caumo, Karin Silva. II. Bazzo,
Maria Luiza. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV.
Título.

**“CARACTERIZAÇÃO DE *Acanthamoeba* spp. E
MICRORGANISMOS RESISTENTES ÀS AMEBAS
OBTIDOS DE APARELHOS DE AR
CONDICIONADO DE AMBIENTES DE UM
HOSPITAL PÚBLICO DE FLORIANÓPOLIS, SC”**

POR

Débora Borgert Wopereis

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



Prof(a). Dr(a). Maria Luiza Bazzo (UFSC – co orientadora)



Prof(a). Dr(a). Adriana Giongo Borges (PUC - RS – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Juliane Araújo Greinert Goulart (FURB - Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Karin Silva Caumo (UFSC – Orientador(a))


Prof(a). Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 07 de fevereiro de 2018.

Dedico este trabalho à minha família pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões. Sem vocês eu não chegaria até aqui.

AGRADECIMENTOS

Nenhuma batalha é vencida sozinha. Ao longo dessa caminhada algumas pessoas estiveram ao meu lado, me dando a mão para que eu chegasse até aqui.

Agradeço primeiramente a Deus por proporcionar a vida e estar sempre presente nela, amparando-me em todas as circunstâncias, mesmo quando eu acreditava não ter mais forças. Por sempre me guiar e ajudar a superar minhas fraquezas;

À minha família, meus pais Luiza e Tarcicio pelo apoio, incentivo, carinho, amor e pela educação que me foi passada, por sempre pensar em um futuro melhor para mim e para minha irmã, almejando para nós o que não puderam ter para si. A minha irmã Andresa, pelo companheirismo, amizade, amor por todo conhecimento compartilhado, por me ajudar sempre que precisei, não apenas durante essa etapa, mas sempre. A vocês não dedico apenas esse trabalho, mas toda a minha vida.

Ao meu namorado Edson, por todo amor e carinho. Pelo incentivo, apoio e compreensão, por me auxiliar até mesmo nas análises das sequências, tudo fica mais fácil com você ao meu lado.

À minha orientadora professora Dr.^a Karin Silva Caumo, que me convidou para a vida científica em 2014, obrigada por todos os conhecimentos trocados a longo desses anos. Obrigada por acreditar em mim, pelo incentivo e dedicação na orientação deste trabalho.

À minha coorientadora professora Dr.^a Maria Luiza Bazzo, por todo ensinamento compartilhado, por abrir as portas do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS) para que eu pudesse realizar boa parte dos experimentos deste trabalho, sou imensamente grata por isso.

À Dr.^a Jaqueline Germano de Oliveira, pela realização dos experimentos de sequenciamento, e à Dr.^a Helena Saramago Peralta, pela execução dos experimentos de investigação da presença de *Legionella* spp. nos isolados amebianos.

À equipe do Laboratório de Estudos de Protozoários Emergentes e Oportunistas (LAPEO) que tornou os meus dias melhores e mais leves, em especial a Carolina Camargo, Fabiana Casara, Jefferson Peres de Macedo, Maria Luiza Carneiro Büchele, Paula Monteiro, Thaís Castro, vocês são muito além do que colegas de laboratório, pois construímos uma amizade a qual levarei comigo para sempre.

À equipe LBMMS por todo auxílio, aprendi muito com vocês no decorrer desses dois anos, tenho um imenso carinho por cada um.

Ao pessoal dos laboratórios vizinhos além do LBMMS, Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada e o Laboratório de Citogenética, por toda troca de conhecimento nos cafés de todos os dias.

À minha jovem irmã de coração Cadiele, que entrou nessa empreitada comigo, por ser um exemplo de persistência, superação e bom humor. Obrigada pelo companheirismo nos momentos bons e ruins, por sua amizade e incentivo.

Aos meus familiares e amigos pelo incentivo, apoio, ajuda, em ocasiões de dificuldade e felicidade.

Aos membros da banca de defesa e qualificação, agradeço por todas as contribuições.

Agradeço também todo o pessoal da Divisão de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, em especial a Mara Cristina Scheffer, Marcellus Reis e Luiz Mota por todo auxílio.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, pelo conhecimento e formação.

À Capes pelo suporte financeiro.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

“Há um ditado chinês que diz que, se dois homens vêm andando por uma estrada, cada um carregando um pão, ao se encontrarem, eles trocam os pães; cada um vai embora com um. Porém, se dois homens vêm andando por uma estrada, cada um carregando uma ideia, ao se encontrarem, trocam as ideias; cada um vai embora com duas. Quem sabe, esse é o mesmo sentido do nosso fazer: repartir ideias, para todos terem pão...”

(Mario Sérgio Cortella)

RESUMO

Espécies de *Acanthamoeba* estão entre as amebas de vida livre mais prevalentes no ambiente. Seu estudo tem importância médica e ambiental, pois além de *Acanthamoeba* spp. apresentarem a capacidade de causar infecções graves, elas também têm a habilidade de abrigar microrganismos em seu interior. Essa característica é relevante, visto que microrganismos potencialmente patogênicos podem estar presentes no interior amebiano, recebendo proteção da ação de agentes externos. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo caracterizar *Acanthamoeba* spp. isoladas de amostras de poeira de aparelhos de ar-condicionado de um hospital público de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, bem como investigar microrganismos resistentes às amebas (MRAs) nos isolados de *Acanthamoeba* spp. Foram incluídos neste estudo, 39 isolados de diferentes ambientes hospitalares. A extração do DNA total dos isolados de *Acanthamoeba* spp. foi realizada a partir das culturas axênicas. O DNA amebiano foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando iniciadores gênero-específico e o fragmento obtido foi sequenciado para determinação dos genótipos. A determinação do potencial patogênico dos isolados foi feita através de ensaios de osmotolerância e termotolerância. Iniciadores específicos foram utilizados para PCR, visando avaliar a presença de *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus* e *Legionella* spp. como MRAs. Todos os isolados caracterizados previamente por morfologia como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* foram confirmados através da técnica de PCR, com a amplificação de um fragmento de aproximadamente 500 pb. A análise das sequências obtidas permitiu classificar os isolados em três genótipos: T4, T5 e T11. Além disso, 7 (18%) dos isolados foram classificados como patogênicos em testes fenotípicos, 27 (69,2%) com patogenicidade intermediária e 5 (12,8%) como não-patogênicos. O estudo de MRAs revelou a presença de *Klebsiella pneumoniae* em 5 (12,8%) isolados amebianos, *Pseudomonas* spp. em todos os isolados amebianos, *Legionella* spp. em 26 (66,7%) isolados amebianos e *Staphylococcus aureus* em 7 (18%) dos 39 isolados amebianos. Considerando que todos os isolados amebianos apresentaram MRAs de importância em infecções relacionadas à assistência à saúde, os dados corroboram para o estudo de *Acanthamoeba* como um importante biomarcador da qualidade do ar em ambientes hospitalares. Os resultados obtidos no presente estudo merecem atenção,

pois as amebas presentes nos aparelhos de ar condicionado podem estar servindo como possíveis fontes de infecções em ambiente hospitalar.

Palavras-chave: *Acanthamoeba* spp.; Microorganismos resistentes às amebas; ambientes hospitalares.

ABSTRACT

Acanthamoeba species are among the most prevalent free-living amoebae in the environment. Its study has medical and environmental importance, because besides *Acanthamoeba* spp. present the ability to cause serious infections, they also have the ability to harbor microorganisms within them. This feature is relevant, since potentially pathogenic microorganisms may be present in the amoebic interior, receiving protection from the action of external agents. In this context, the present study aimed to characterize *Acanthamoeba* spp. isolated from dust samples of air conditioners from a public hospital in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil, as well as to investigate amoeba-resistant microorganisms (ARMs) in the isolates of *Acanthamoeba* spp. This study included 39 isolates from different hospital environments. The extraction of total DNA from the isolates of *Acanthamoeba* spp. was carried out from the axenic cultures. Amoebic DNA was subjected to polymerase chain reaction (PCR) using genus-specific primers and the obtained fragment was sequenced for genotype determination. The determination of the pathogenic potential of the isolates was done through osmotolerance and thermotolerance tests. Specific primers were used for PCR to evaluate the presence of *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus* and *Legionella* spp. as ARMs. All isolates previously characterized by morphology as belonging to the genus *Acanthamoeba* were confirmed by the PCR technique with the amplification of a fragment of approximately 500 bp. The analysis of the sequences obtained allowed to classify the isolates into three genotypes: T4, T5 and T11. In addition, 7 (18%) of the isolates were classified as pathogenic in phenotypic tests, 27 (69.2%) with intermediate pathogenicity and 5 (12.8%) as non-pathogenic. The study of ARMs revealed the presence of *Klebsiella pneumoniae* in 5 (12.8%) amoebic isolates, *Pseudomonas* spp. in all amoebic isolates, *Legionella* spp. in 26 (66.7%) amoebic isolates and *Staphylococcus aureus* in 7 (18%) of 39 amoebic isolates. Considering that all amoebic isolates presented important microorganisms in infections related to health care, the data corroborate for the study of *Acanthamoeba* as an important biomarker of air quality in hospital environments. The results obtained in the present study deserve attention, since the amoebas present in the air conditioners may be serving as possible sources of infections in a hospital environment.

Keywords: *Acanthamoeba* spp.; amoeba-resistant microorganisms; hospital environments.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas evolutivas de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	29
Figura 2. Caso de ceratite amebiana.....	36
Figura 3. Produtos de amplificação obtidos por reação em cadeia da polimerase do fragmento ASA.S1 do gene 18S rDNA de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	56
Figura 4. Crescimento do isolado amebiano do setor de oftalmologia (filtro da sala de espera) no estudo do potencial patogênico.....	61
Figura 5. Presença de bactérias resistentes às amebas nos isolados amebianos visualizadas por meio de microscopia de contraste de fase.....	66
Figura 6. Produtos de amplificação obtidos por reação em cadeia da polimerase utilizando iniciadores específicos para <i>K. pneumoniae</i>	68
Figura 7. Produtos de amplificação obtidos por reação em cadeia da polimerase utilizando iniciadores específicos para <i>Pseudomonas</i> spp..	70
Figura 8. Produtos de amplificação obtidos por reação em cadeia da polimerase utilizando iniciadores específicos para <i>S. aureus</i>	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação morfológica de <i>Acanthamoeba</i> spp. segundo critérios de Pussard e Pons (1977)	31
Quadro 2. Informações sobre os iniciadores utilizados para investigação de microrganismos resistentes às amebas por reação em cadeia da polimerase	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização genotípica de isolados acantamebianos obtidos a partir da poeira de aparelhos de ar condicionado de um hospital público de Florianópolis, SC.....	58
Tabela 2. Estudo da patogenicidade de isolados de <i>Acanthamoeba</i> por parâmetros fisiológicos (osmotolerância e termotolerância).....	62
Tabela 3. Resultado das reações em cadeia em polimerase para detecção de <i>Legionella</i> spp.	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Aleta
ANN – Ágar não-nutriente
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASA.S1 – *Acanthamoeba Specific Amplimer S1*
ATCC – American Type Culture Collection
AVL – Amebas de vida livre
BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*
CAC – Centro Ambulatorial Cirúrgico
CC – Centro Cirúrgico
CO – Centro Obstétrico
CCI – Clínica Cirúrgia I
CCII – Clínica Cirúrgia II
CMI – Clínica Médica I
CMII – Clínica Médica II
Ct – *Cycle threshold*
DNA – Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)
dNTP – Desoxirribonucleotideo trifosfato (*Deoxyribonucleotide triphosphate*)
EMG – Emergência
EST – Esterilização
F – Filtro
FC – Filtro Central
G/D – Grelha/Difusor
GIN – Ginecologia
HEM – Hemodiálise
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus*)
KCl – Cloreto de potássio
KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
LAPEO – Laboratório de Estudos de Protozoários Emergentes e Oportunistas
M – Molar
MEGA – *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
MRA – Microrganismo resistente à ameba
MRAs – Microrganismos resistentes às amebas
MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (*Methicillin - resistant Staphylococcus aureus*)
mM – Micro Molar

NBR – Norma Brasileira
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
NCTC – *National Collection of Type Cultures*
OFT – Oftalmologia
pb – Pares de Base
PED – Pediatria
PBS – Tampão fosfato salino (*Phosphate buffered saline*)
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
pH – Potencial hidrogeniônico
PYG – Peptona, Extrato de Levedura e Glicose (*Peptone, Yeast Extract and Glucose*)
QT – Quimioterapia
RE – Resolução
rDNA – Ácido desoxirribonucleico ribossomal (*Ribosomal Deoxyribonucleic acid*)
SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
sp. – Espécie
spp. – Espécies
TRIS - HCl – Cloridrato de Tris (hidroximetil) aminometano
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
UTI – Unidade de Terapia Intensiva
x g – Força gravitacional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 AMEBAS DE VIDA LIVRE	27
2.2 O GÊNERO <i>Acanthamoeba</i>	28
2.3 CLASSIFICAÇÃO <i>Acanthamoeba</i> spp.	30
2.3.1 Classificação morfológica e molecular	30
2.3.2 Marcadores de patogenicidade	33
2.4.1 Ceratite amebiana	34
2.4.2 Infecções sistêmicas causadas por <i>Acanthamoeba</i> spp.	37
2.5 MICRORGANISMOS RESISTENTES A <i>Acanthamoeba</i> spp.	38
2.6 <i>Acanthamoeba</i> spp. E SUA RELAÇÃO COM A QUALIDADE DO AR EM AMBIENTES INTERNOS	40
3. OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVO GERAL	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4. METODOLOGIA	45
4.1 ISOLADOS DE <i>Acanthamoeba</i> spp.	45
4.2 CEPAS CONTROLE	45
4.4 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DOS ISOLADOS DE <i>Acanthamoeba</i> spp.	46
4.5 CONFIRMAÇÃO DO GÊNERO <i>Acanthamoeba</i> POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	46
4.6 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS FRAGMENTOS DO 18S rDNA de <i>Acanthamoeba</i> spp.	47
4.7 ESTUDO DA PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE <i>Acanthamoeba</i> spp. POR PARÂMETROS FISIOLÓGICOS: OSMOTOLERÂNCIA E TERMOTOLERÂNCIA	48
4.7.1 Osmotolerância	48
4.7.2 Termotolerância	48
4.8 PESQUISA DE MICRORGANISMOS RESISTENTES ÀS AMEBAS	49
4.8.1 Investigação da presença de microrganismos resistentes às amebas por microscopia	49
4.8.3 Investigação da presença de <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Pseudomonas</i> spp. e <i>Staphylococcus aureus</i> nos isolados de <i>Acanthamoeba</i> spp.	50

4.8.4 Investigação da presença de *Legionella* spp. nos isolados de *Acanthamoeba* spp. 53

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 55

5.1 EXTRAÇÃO DE DNA E CONFIRMAÇÃO DO GÊNERO *Acanthamoeba* POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE 55

5.3 CLASSIFICAÇÃO GENOTÍPICA DE *Acanthamoeba* spp. 57

5.4 ESTUDO DA PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE *Acanthamoeba* POR PARÂMETROS FISIOLÓGICOS: OSMOTOLERÂNCIA E TERMOTOLERÂNCIA 60

5.5 PESQUISA DE MICRORGANISMOS RESISTENTES ÀS AMEBAS 66

5.5.1 Investigação da presença de microrganismos resistentes às amebas por microscopia 66

5.5.2 Investigação da presença de *Klebsiella pneumoniae* em isolados de *Acanthamoeba* spp. 67

5.5.3 Investigação da presença de *Pseudomonas* spp. em isolados de *Acanthamoeba* spp. 69

5.5.4 Investigação da presença de *Staphylococcus aureus* em isolados de *Acanthamoeba* spp. 71

5.5.5 Investigação da presença de *Legionella* spp. em isolados de *Acanthamoeba* spp. 74

6. CONCLUSÕES 81

REFERÊNCIAS 83

APÊNDICE A - Amostras de poeira obtidas de aparelhos de ar condicionado e isolamento de amebas de vida livre em hospital público de Florianópolis, SC 103

ANEXO A – Meio Proteose Peptona Extrato de Levedo e Glicose (PYG) pH 6,5 ± 0,2 105

ANEXO B – Ágar Não-Nutriente 1,5% 106

1. INTRODUÇÃO

Amebas de vida livre (AVL) são protozoários amplamente dispersos na natureza, isoladas de uma variedade de ambientes naturais e antropogênicos, como água, solo, estojos de lentes de contato, aparelhos de ar condicionado, entre outros (THOMAS et al., 2010). Dentre as AVL, o gênero *Acanthamoeba* vem ganhando destaque nos últimos anos, devido ao aumento do número de casos de infecções relacionadas a este protozoário, principalmente ceratite amebiana e encefalite amebiana granulomatosa (SIDDIQUI; KHAN, 2012), bem como por sua importância ambiental relacionada a sua interação com outros microrganismos (CATEAU et al., 2014). Espécies de *Acanthamoeba* apresentam dois estágios em seu ciclo de vida, o de trofozoíto, forma metabolicamente ativa e infectiva. E a forma de cisto, estágio de dormência, o qual é altamente resistente a condições adversas como depleção de nutrientes, mudanças de temperatura, pH e osmolaridade (DA ROCHA-AZEVEDO; TANOWITZ; MARCIANO-CABRAL, 2009).

Na natureza, trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. alimentam-se principalmente de bactérias, fungos e algas por fagocitose (TRABELSI et al., 2012). Normalmente durante esse processo, microrganismos como bactérias e fungos sofrem digestão no interior de fagolisossomas amebianos (KEBBI-BEGHDADI; GREUB, 2014). Entretanto, alguns microrganismos evoluíram e se tornaram resistentes a esses protozoários, sendo internalizados pelas amebas, tornando-se capazes de sobreviver e em muitos casos, a se multiplicar no interior amebiano até serem novamente liberados para o exterior, por lise desse protozoário ou por meio de vesículas (GREUB; RAOULT, 2004). Esses microrganismos são chamados microrganismos resistentes às amebas (MRAs) (GUIMARAES et al., 2016). Várias bactérias, fungos, protozoários e vírus patogênicos já foram descritos como MRAs (BALCZUN; SCHEID, 2017).

Para os MRAs, o interior amebiano é um ambiente favorável, pois esses microrganismos são protegidos mais facilmente da ação de antimicrobianos e de substâncias biocidas, em especial quando as amebas estão encistadas. Dessa forma, as amebas funcionam como reservatório e veículo destes MRAs, permitindo a persistência e distribuição desses no ambiente. Por esse motivo, *Acanthamoeba* é também conhecida como o “Cavalo de Tróia” do mundo microbiano (SCHEID, 2014; GUIMARAES et al., 2016).

Surtos de infecções em ambientes hospitalares têm sido associados a sistemas de condicionamento de ar contaminados por bactérias. Algumas dessas bactérias já foram descritas como MRAs (HAUPT et al., 2012; DECKER; PALMORE, 2013). Além disso, isolados de *Acanthamoeba* contendo bactérias em seu interior já foram obtidos de aparelhos de ar condicionado (MASCHIO; CORÇÃO; ROTT, 2015). Sabe-se que o controle da qualidade do ar interno desempenha um papel importante na prevenção de infecções em ambientes hospitalares (LEUNG; CHAN, 2006). Entretanto, a troca do ar nesses ambientes nem sempre ocorre de forma satisfatória, favorecendo o desenvolvimento de microrganismos (GRAUDENZ; DANTAS et al., 2007). Devido à natureza oportunista de *Acanthamoeba* spp. e seu possível papel como reservatório de patógenos, sugere-se que estas podem servir como biomarcador de qualidade do ar interno (CHAN et al., 2011; OOI et al., 2017).

Neste contexto, questiona-se se isolados de *Acanthamoeba* obtidos de poeira de aparelhos ar condicionados de diferentes ambientes de um hospital poderiam estar carreando bactérias potencialmente patogênicas como *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella* spp. *Pseudomonas* spp. e *Staphylococcus aureus* em seu interior. Sabendo que a caracterização genotípica e do potencial patogênico dos isolados amebianos tem relação com uma maior capacidade de adaptação a vida parasitária e nesse sentido com a capacidade de causar doença em humanos, questiona-se a qual genótipo esses isolados acantamebianos pertencem e qual seria a patogenicidade dos mesmos.

Sabendo que *Acanthamoeba* spp. podem hospedar uma diversidade de microrganismos patogênicos em seu interior e que aparelhos de ar condicionado servem como um habitat favorável para o desenvolvimentos de amebas e MRAs, considera-se epidemiologicamente importante o estudo da presença de *Acanthamoeba* spp. e da diversidade microbiana carregada por estas em ambientes hospitalares, uma vez que são possíveis focos de infecções relacionadas à assistência à saúde e de transmissão de patógenos oportunistas, pois nestes locais as pessoas estão mais debilitadas e suscetíveis às infecções.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AMEBAS DE VIDA LIVRE

As amebas de vida livre (AVL) são protozoários amplamente dispersos na natureza, encontrados em ambientes naturais e antropogênicos (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004). Estas amebas já foram isoladas de diversas fontes, tais como: rios (NIYYATI et al., 2012), lagos (ONICHANDRAN et al., 2013), oceanos (LIU et al., 2006), esgotos (LASS et al., 2017), piscinas (CAUMO; ROTT, 2011), água de torneira (MARCIANO-CABRAL; JAMERSON; KANESHIRO, 2010), água engarrafada (MASCHIO et al., 2014), estojos e soluções de limpeza de lentes de contato (GOMES et al., 2016), solos (REYES-BATLLE et al., 2016), poeira (NIYYATI et al., 2009), sistemas de ar condicionado (CHAN et al., 2011), unidades dentais e de diálise (HASSAN et al., 2012), dentre outros. Possuem caráter anfitriônico, pois são capazes de viver livremente no ambiente, como também acometer o homem e outros animais causando infecções (CASTRILLÓN; OROZCO, 2013).

As espécies de AVL consideradas patogênicas são: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* e *Sappinia pedata* (VISVESVARA, 2013). O gênero *Acanthamoeba* inclui espécies que estão associadas principalmente a infecções de córnea e encefalites, mas também podem causar ulcerações na pele, sinusites e acometer outros órgãos, como pulmões e rins (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003). *B. mandrillaris* está associada a casos de infecções cutâneas e encefalites, sendo esta última muito semelhante à encefalite causada por *Acanthamoeba* spp. (TRABELSI et al., 2012). *N. fowleri* é o agente etiológico da meningoencefalite amebiana primária, uma infecção extremamente letal, caracterizada como doença aguda e fulminante (SIDDIQUI et al., 2016). *S. pedata* foi descrita como o agente de um caso de encefalite, relatado em um indivíduo imunocompetente no estado do Texas, Estados Unidos (GELMAN et al., 2001).

As infecções causadas por *Acanthamoeba* spp. e *B. mandrillaris* atingem indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes, dependendo do sítio de infecção. Em contrapartida, *N. fowleri* atinge indivíduos imunocompetentes, principalmente crianças e jovens adultos, levando frequentemente à morte (VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007).

Nos últimos anos, o estudo do gênero *Acanthamoeba* ganhou destaque na comunidade científica, devido ao aumento do número de

casos de infecções ocasionadas por este protozoário (SIDDIQUI; KHAN, 2012), bem como pela importância deste gênero no ambiente por sua interação com outros microrganismos (CATEAU et al., 2014; FIESELER et al., 2014; SALAMEH et al., 2015; BRELAND; BECKMANN, 2016; NUNES et al., 2016; OMAÑA-MOLINA et al., 2016).

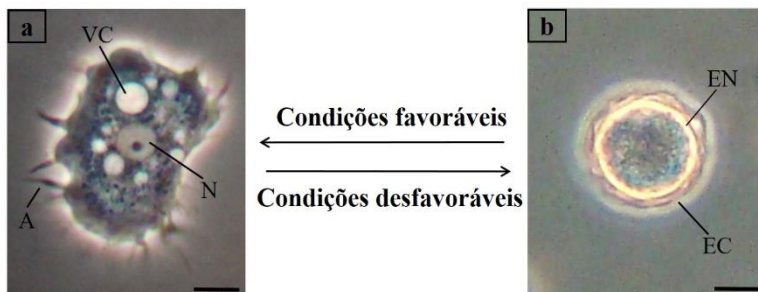
2.2 O GÊNERO *Acanthamoeba*

A primeira descrição de *Acanthamoeba* spp. foi feita por Castellani em 1930, quando isolou este protozoário a partir de uma cultura de leveduras (SIDDIQUI; KHAN, 2012). Entretanto, as primeiras evidências deste gênero como possível agente de infecções no homem foi em 1958, durante a produção de uma vacina contra a poliomielite (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003). A vacina apresentava-se contaminada por *Acanthamoeba* spp. e pós-inoculação em macacos e camundongos, acarretou na morte desses animais por encefalite amebiana (VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007; VISVESVARA, 2013).

Os primeiros relatos de infecções acantamebianas no homem foram nos anos de 1960 e 1970 e incluem casos de ceratites (LUND; STEFANI; DECHANT, 1978), encefalites (FOWLER; CARTER, 1965; JAGER; STAMM, 1972) e ulcerações de pele (GULLETT et al., 1979). A partir de então, houve um aumento importante no número de casos de infecções causadas por estas amebas, principalmente em indivíduos imunocomprometidos e usuários de lentes de contato (SIDDIQUI; KHAN, 2012).

Segundo a classificação tradicional de Levine et al. (1980) as espécies que compõem o gênero *Acanthamoeba* pertencem ao Reino Protista, Subreino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Classe Lobosea e Ordem Amoebida. Apesar desta classificação continuar em vigor atualmente, uma nova classificação utilizando ferramentas de ultraestrutura e filogenia molecular foi proposta por membros da Sociedade Internacional de Protozoologia em 2005 e revisada em 2012. Conforme esta última classificação, o gênero *Acanthamoeba* encontra-se no Supergrupo Amoebozoa (ADL et al., 2005, 2012). Em seu ciclo de vida, esse protozoário pode ser encontrado sob duas formas: a forma de trofozoíto metabolicamente ativa, capaz de se multiplicar por divisão binária longitudinal, e a de cisto, forma de resistência, capaz de sobreviver a condições adversas (Figura 1) (TRABELSI et al., 2012).

Figura 1. Formas evolutivas de *Acanthamoeba* spp.



a) Trofozoíto, forma infectiva, metabolicamente ativa: Núcleo (N), Vacúolo contrátil (VC) e Acantopódio (A); b) Cisto, forma de resistência do parasito: Endocisto (EN) e Ectocisto (EC). Barra= 10 μ m. Fonte: A autora.

A forma de trofozoíto caracteriza-se pela presença de pseudópodes delgados, denominados acantopódios, responsáveis por funções relacionadas à movimentação, adesão e alimentação celular (SANDSTRÖM; SAEED, ABD, 2011; LORENZO-MORALES et al., 2013). Além disso, apresentam em seu citoplasma diversos vacúolos, como o vacúolo contrátil, responsável pelo controle osmótico da célula e vacúolos digestivos (SIDDIQUI; KHAN, 2012). Os trofozoítos se alimentam de bactérias e se reproduzem de forma assexuada por divisão binária. Dispõem de um único núcleo, com nucléolo central evidente. O tamanho do trofozoíto pode variar entre 14 e 40 μ m, dependendo do genótipo e da espécie (VISVESVARA, 2013; MAYCOCK; JAYASWAL, 2016;).

O estágio de cisto é caracterizado por apresentar tamanho que varia de 10 a 25 μ m e uma dupla parede. A parede interna é denominada endocisto e a parede externa ectocisto (Figura 1) (VISVESVARA, 2013). Também apresentam ostíolos que são pequenos orifícios (poros) utilizados para monitorar condições ambientais, e além disso, possui um local denominado opérculo, pelo qual o trofozoíto presente no interior do cisto emerge durante o desencistamento (SCHUSTER, 2002; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015). O encistamento ocorre na existência de condições adversas como depleção de nutrientes, mudanças de temperatura, pH e osmolaridade. Este processo possibilita que a célula amebiana resista a condições extremas, tornando-a resistente à cloração, a agentes biocidas, à ação de antibióticos, dentre outros (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

Recentemente foi descrita uma espécie de *Acanthamoeba* (*Acanthamoeba pyriformis*) com estágios adicionais em seu ciclo de vida.

Além dos estágios de trofozoíto e cisto conhecidos até o momento, essa espécie possui facultativamente esporos oriundos de corpos frutíferos (esporocarpos). Essa descoberta abre um questionamento sobre a presença de uma possível fase de frutificação no gênero, o que até então era desconhecida (TICE et al., 2016; CORSARO et al., 2017).

2.3 CLASSIFICAÇÃO *Acanthamoeba* spp.




2.3.1 Classificação morfológica e molecular

Em 1977, Pussard e Pons sugeriram uma classificação para *Acanthamoeba* spp. baseada na morfologia dos cistos, dividindo as espécies descritas até aquele momento em três grupos (Quadro 1).

Dentre os grupos, o grupo II se destaca por ser o maior, incluindo espécies de *Acanthamoeba* com ampla distribuição e comumente isoladas, bem como a maioria das espécies patogênicas (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004; KHAN, 2006; CASTRILLÓN; OROZCO, 2013).

A classificação morfológica baseada na morfometria dos cistos foi aceita por outros autores da época. Em 1988, Page, ao elaborar a chave dicotômica para identificação de amebas de vida livre, incluiu os critérios propostos por Pussard e Pons (1977) e adicionou características de trofozoítos, como o comportamento destas formas frente a diferentes temperaturas e tipo de locomoção (KHAN, 2006).

Quadro 1. Classificação morfológica de *Acanthamoeba* spp. segundo critérios de Pussard e Pons (1977)

Grupo	Ilustração	Formato Endocisto	Formato Ectocisto	Tamanho do cisto	Espécies incluídas no grupo
I		Estrelado	Liso ou rugoso	$\geq 18 \mu\text{m}$	<i>Acanthamoeba astronyxis</i> <i>Acanthamoeba comandoni</i> <i>Acanthamoeba echinulata</i> <i>Acanthamoeba pearcei</i> <i>Acanthamoeba tubiashi</i>
II		Poligonal, triangular, levemente estrelado, oval ou redondo	Irregular ou rugoso	$\leq 18 \mu\text{m}$	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Acanthamoeba divionensis</i> <i>Acanthamoeba griffini</i> <i>Acanthamoeba hatchetti</i> <i>Acanthamoeba lugdunensis</i> <i>Acanthamoeba mauritaniensis</i> <i>Acanthamoeba paradvionensis</i> <i>Acanthamoeba polyphaga</i> <i>Acanthamoeba quina</i> <i>Acanthamoeba stevensoni</i> <i>Acanthamoeba rhyodes</i> <i>Acanthamoeba triangularis</i>
III		Arredondado, nunca estrelado	Fino, liso ou ondulado	$\leq 18 \mu\text{m}$	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i> <i>Acanthamoeba healyi</i> <i>Acanthamoeba jacobsi</i> <i>Acanthamoeba lenticulata</i> <i>Acanthamoeba palestinesis</i> <i>Acanthamoeba pustulosa</i> <i>Acanthamoeba royreba</i>

Fonte: A autora. Baseado critérios Pussard e Pons (1977).

Por muitos anos, o critério morfológico foi o único utilizado para classificação de *Acanthamoeba* spp., porém devido a observação de que dependendo das condições de cultura pode ocorrer variação da morfologia dos cistos, a classificação morfológica foi considerada inconsistente (VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007; CHAN et al., 2011). Com intuito de diminuir esse tipo de interferência, atualmente utiliza-se métodos moleculares associados à classificação morfológica. A metodologia mais aceita para classificar *Acanthamoeba* spp. é baseada nas sequências da subunidade menor do gene 18S rDNA, de modo que o gênero pode ser dividido em genótipos. Cada genótipo exibe 5% ou mais de sequências divergentes entre os diferentes genótipos. Algumas espécies, como por exemplo *A. castellanii* e *A. polyphaga* são consideradas polifiléticas, pois pertencem a vários genótipos distintos, enquanto outras como *A. lenticulata*, são caracterizados exclusivamente como pertencentes ao genótipo T5 (STORHARD et al., 1998; KHAN, 2006; CORSARO et al., 2017).

Neste contexto, o estudo do fragmento ASA.S1 (*Acanthamoeba Specific Amplimer S1*) do gene 18S rDNA vem sendo amplamente utilizado nas análises taxonômicas de *Acanthamoeba*, servindo de referência para identificação genotípica de isolados/amostras clínicas e ambientais deste protozoário (SCHROEDER et al., 2001; TRABELSI et al., 2012).

Até o presente, o gênero *Acanthamoeba* é composto por 21 genótipos (T1 a T21), sendo que o genótipo T2 é dividido em T2a e T2b, devido à dissimilaridade existente intragenótipo de 4,9%, ou seja, muito próximo do ponto de corte de 5% para estabelecer os diferentes genótipos (MAGHSOOD et al., 2005; TICE et al., 2016; CORSARO et al., 2015, 2017). Os genótipos relacionados a infecções em humanos são: T1, T2a, T3, T4, T5, T6, T9, T10, T11, T12, T15 e T18 (SIDDIQUI; KHAN, 2012; QVARNSTROM; NERAD; VISVESVARA, 2013; HAJIALILO et al., 2016).

A maior parte das infecções acantamebianas é causada pelo genótipo T4, o que pode estar associado a maior virulência e menor suscetibilidade aos antimicrobianos (MAGHSOOD et al., 2005). Além disso, esse é o genótipo com maior prevalência ambiental, sugerindo que existe uma maior exposição destas amebas aos hospedeiros suscetíveis, o que poderia justificar a correlação do genótipo T4 a maioria dos casos de infecções acantamebianas (BOOTON et al., 2005; SIDDIQUI; KHAN, 2012).

2.3.2 Marcadores de patogenicidade

Vários fatores estão envolvidos na patogênese de *Acanthamoeba*, entretanto os três principais são: o hospedeiro, a ameba e as condições ambientais onde acontece a interação parasito-hospedeiro. Resumidamente o processo de patogênese inicia-se com a adesão amebiana à célula hospedeira, seguido da secreção de proteases celulares pela ameba resultando na fagocitose e/ou morte da célula hospedeira (LORENZO-MORALES et al., 2013). Isolados patogênicos de *Acanthamoeba* geralmente apresentam maior termotolerância, taxa de crescimento, capacidade de adesão a células hospedeiras e evasão da resposta imunológica (VISVESVARA, MOURA; SCHUSTER, 2007; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

Estudos relacionados ao potencial patogênico de *Acanthamoeba* são frequentemente realizados a fim de verificar quais são as características biológicas intrínsecas de isolados patogênicos que possam servir como marcadores de patogenicidade. Neste contexto ensaios *in vivo* e *in vitro* são utilizados (DA ROCHA-AZEVEDO; SILVA-FILHO et al., 2007).

Dentre os modelos *in vivo* para avaliação da patogenicidade de *Acanthamoeba* é descrito predominantemente o uso de ratos e coelhos (REN; WU, 2010). No entanto, modelos *in vitro* têm sido utilizados a fim de reduzir o uso de animais em pesquisa. Dentre eles podemos citar: a avaliação do efeito citopático (WALOCHNICK; OBWALLER; ASPOCK, 2000), da atividade proteolítica (DA ROCHA-AZEVEDO; SILVA-FILHO et al., 2007) e de parâmetros fisiológicos (KHAN, JARROLL, PAGET, 2001).

A avaliação da patogenicidade de *Acanthamoeba* por parâmetros fisiológicos é amplamente utilizada pois apresenta menor custo, além de ser uma metodologia de fácil execução (KHAN, JARROLL, PAGET, 2001). Pesquisas prévias verificaram que o crescimento de isolados acantamebianos em temperaturas elevadas (termotolerância) e em condições de hiperosmolaridade (osmotolerância), podem ser utilizados para diferenciar isolados de *Acanthamoeba* patogênicos de não patogênicos (KHAN, 2006). Esses ensaios consistem basicamente no uso de ágar não nutriente cobertos com uma camada bacteriana (geralmente *Escherichia coli* ou *Klebsiella aerogenes* – que servem de alimento para as amebas) no qual é inoculado trofozoítos de *Acanthamoeba*. Posterior ao tempo de incubação é verificado se o isolado foi capaz de se desenvolver nas condições submetidas. No ensaio de osmotolerância o ágar não nutriente é acrescido de manitol e na termotolerância a

temperatura de incubação avaliada é aumentada em comparação com o que é frequentemente utilizado para o crescimento de *Acanthamoeba*. Isolados patogênicos são capazes de se desenvolver em meio hiperosmolar e em temperaturas elevadas (KHAN, JARROLL, PAGET, 2001; CAUMO et al., 2009).

Os mecanismos exatos pelos quais um isolado patogênico de *Acanthamoeba* se adapta a temperaturas elevadas e a alta osmolaridade mantendo suas atividades habituais ainda permanecem desconhecidos (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

2.4 INFECÇÕES CAUSADAS POR *Acanthamoeba* spp.

As espécies de *Acanthamoeba* possuem ampla distribuição na natureza, o que promove o constante contato do homem com este protozoário. Infecções acantamebianas podem acometer indivíduos saudáveis e indivíduos imunocomprometidos, com maior frequência de casos de ceratite amebiana e encefalite amebiana granulomatosa (ABDUL MAJID et al., 2017; LASS et al., 2017). Entretanto, infecções acantamebianas podem acometer a pele, pulmões, rins, fígado, pâncreas e outros órgãos (TRABELSI et al., 2012; CHOMICZ et al., 2015).

2.4.1 Ceratite amebiana

A ceratite amebiana é a infecção mais comum causada por *Acanthamoeba* spp., caracterizada por um intenso processo inflamatório da córnea, resultante da infecção causada por este protozoário, a qual é extremamente dolorosa e se não tratada precocemente pode levar à cegueira (TRABELSI et al., 2012; HAJIALILO et al., 2016). A maioria dos casos de ceratite amebiana acometem usuários de lentes de contato, porém há relatos de casos de indivíduos com trauma corneano expostos à água ou solo contaminados (SIDDIQUI; KHAN, 2012; LORENZO-MORALES et al., 2013).

Nos últimos anos, houve um aumento no número de casos de ceratite amebiana nos países em desenvolvimento, o que se correlaciona com o aumento do número de usuários de lentes de contato (TRABELSI et al., 2012). Estima-se que cerca de 85% dos casos de ceratite amebiana ocorra em usuários de lentes de contato e em torno de 10 a 15% em não usuários (LORENZO-MORALES et al., 2013; CHOMICZ et al., 2015). Nos Estados Unidos é estimado que ocorra 1,36 casos de ceratite amebiana por um milhão de habitantes e na Inglaterra cerca de 17 a 21

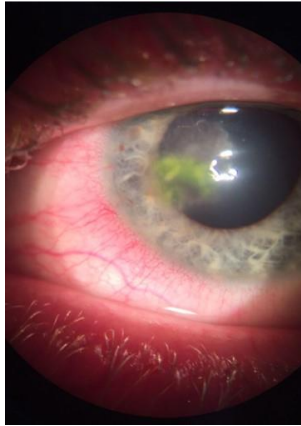
casos por milhão de habitantes (TRABELSI et al., 2012). No Brasil, um estudo retrospectivo de 20 anos realizado em um centro de oftalmologia de São Paulo, relata que das 581 solicitações de exames para investigação de casos de ceratite amebiana, 185 (32%) foram confirmados como tal (CARVALHO et al., 2009).

O ato de retirar e colocar as lentes pode ocasionar microtraumatismos corneanos, que servem de porta de entrada para *Acanthamoeba* spp., sendo crucial a presença destas lesões para o início da infecção. Além disso, existem efeitos traumáticos indiretos decorrentes do uso de lentes de contato por longo período de tempo. O uso excessivo pode resultar em hipóxia e hipercapnia local, que pode alterar a fisiologia da córnea de modo a torná-la mais susceptível a infecções microbianas, incluindo *Acanthamoeba* spp. (KHAN, 2006; IBRAHIM; BOASE; CREE, 2009).

Múltiplos fatores estão envolvidos no risco de usuários de lentes de contato desenvolverem a ceratite amebiana, entre eles, uso de lentes de contato por longo período, limpeza inadequada dos estojos e das lentes de contato, formação de biofilme nos estojos e exposição à água que mesmo tratada pode estar contaminada (SIDDIQUI; KHAN, 2012).

A ceratite por *Acanthamoeba* geralmente é unilateral, porém casos de infecção bilateral já foram relatados (CARNT; STAPLETON, 2016). Clinicamente os sintomas estão ligados à invasão e à degradação dos componentes da córnea. No estágio inicial da infecção, os principais sintomas são de dor intensa, a qual geralmente é desproporcional a lesão, vermelhidão, lacrimejamento, fotofobia e redução da acuidade visual (Figura 2) (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015; MAYCOCK; JAYASWAL, 2016). Nos estágios posteriores da infecção pode ocorrer a formação de um infiltrado estromal em forma de anel, e se não tratada, pode evoluir para ulceração do epitélio da córnea, perfuração, perda da acuidade visual, cegueira e enucleação ocular (TRABELSI et al., 2012; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

Figura 2. Caso de ceratite amebiana



Características clínicas de caso de ceratite amebiana em estágio inicial: apresentando desepitelização da córnea (corado por fluoresceína, em verde) e vermelhidão decorrente do intenso processo inflamatório. Fonte: Laboratório de Estudos de Protozoários Emergentes e Oportunistas (LAPEO) - UFSC.

O diagnóstico precoce é essencial para que o sucesso terapêutico seja alcançado. O mais importante é que exista a suspeita clínica de ceratite amebiana, pois o atraso no diagnóstico está diretamente relacionado a um mal prognóstico, com casos de infecção recidivante e mesmo perda da visão (ALKHARASHI et al., 2015). O padrão ouro para o diagnóstico é a cultura de *Acanthamoeba* spp. a partir de amostras de raspado ou biópsia da córnea. A amostra é inoculada em placas de ágar não-nutriente com uma camada bacteriana de *Escherichia coli* ou *Enterobacter aerogenes* (VISVESVARA, 2013), que servem de nutriente para crescimento amebiano. A cultura pode demorar mais de uma semana para o aparecimento de formas do protozoário, por este motivo metodologias moleculares são utilizadas para obter resultados mais rápidos e eficientes em termos de sensibilidade e especificidade (DA ROCHA-AZEVEDO; TANOWITZ; MARCIANO-CABRAL, 2009; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

O tratamento da ceratite amebiana é dificultado pelas formas císticas resistentes a maioria dos medicamentos disponíveis, ocasionando infecções prolongadas. As formas trofozoíticas geralmente respondem bem aos antimicrobianos tópicos. Os medicamentos mais utilizados para ceratite amebiana são diamidinas e biguanidas, pois são os mais eficazes frente aos cistos de *Acanthamoeba* spp. Entretanto esses medicamentos são altamente citotóxicos para as células corneanas (LORENZO-

MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015; MAYCOCK; JAYASWAL, 2016).

2.4.2 Infecções sistêmicas causadas por *Acanthamoeba* spp.

As infecções sistêmicas causadas por *Acanthamoeba* spp. são consideradas infecções oportunistas, pois acometem indivíduos imunocomprometidos e imunodeprimidos (SIDDQUI; KHAN, 2012; ABDUL MAJID et al., 2017). Atingem principalmente pacientes transplantados, portadores de doenças crônicas, indivíduos com HIV/SIDA, tuberculose, lúpus eritematoso sistêmico e pacientes que fazem tratamento quimio e radioterápico (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004; BEHERA; SATPATHY; TRIPATHI, 2016). Entretanto alguns casos já foram relatados em indivíduos imunocompetentes (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

O trato respiratório e pequenas ulcerações de pele podem servir de porta de entrada para espécies de *Acanthamoeba*, que através da via hematogênica podem atingir órgãos como cérebro, pulmões, rins, fígado, pâncreas, resultando na infecção do local acometido (VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007; WALOCHNIK et al., 2008; GALARZA et al., 2009). A encefalite amebiana granulomatosa é a principal infecção sistêmica causada por esse gênero de ameba, sendo uma infecção de início lento e insidioso do sistema nervoso central (VISVESVARA, 2013).

Dentre os sintomas presentes na encefalite amebiana estão: dores de cabeça, rigidez de nuca, anormalidades mentais, náuseas, vômitos, febre baixa, letargia, distúrbios visuais, ataxia cerebelar, hemiparesia, convulsões e coma (KHAN, 2006; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007). As lesões granulomatosas são características da infecção e são resultantes da intensa inflamação causada pela presença de formas do protozoário no tecido acometido (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; PARIJA; KP; VENUGOPAL, 2015).

Como os sinais clínicos da encefalite amebiana granulomatosa são inespecíficos, muitas vezes a doença pode ser diagnosticada erroneamente como meningite bacteriana, encefalite viral, neurocisticercose, dentre outras (DA ROCHA-AZEVEDO; TANOWITZ; MARCIANO-CABRAL, 2009). Por esta razão, a maioria dos casos diagnosticados é feito *post mortem*, por meio do achado de formas císticas e trofozoíticas na biópsia tecidual (SIDDQUI; KHAN, 2012).

O tratamento é baseado na combinação de antimicrobianos, administrados por via intravenosa e raramente levam a um bom prognóstico. São poucos os relatos de pacientes que conseguem sobreviver a esta infecção, com índice de mortalidade maior que 90%, devido à dificuldade e atraso no diagnóstico da doença e ausência de terapia efetiva (TRABELSI et al., 2012; PARIJA; KP; VENUGOPAL, 2015).

2.5 MICRORGANISMOS RESISTENTES A *Acanthamoeba* spp.

Na natureza, os trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. alimentam-se de bactérias, fungos, leveduras, algas ou pequenas partículas orgânicas (TRABELSI et al., 2012). Contudo, alguns desses microrganismos como bactérias e fungos, desenvolveram estratégias que possibilitam que eles resistam à fagocitose e digestão das amebas, de modo a tornarem-se microrganismos resistentes às amebas (MRAs) (IOVIENO et al., 2010; GUIMARAES et al., 2016).

Muitos MRAs têm capacidade de sobreviver ou de proliferar no interior das amebas (SCHEID, 2014). O estilo de vida intracelular implica na proteção desses microrganismos a condições adversas, como resistência à ação de antimicrobianos e biocidas, o que está relacionado com a formação do estágio cístico amebiano altamente resistente. Essas condições facilitam a sobrevivência e disseminação desses microrganismos (IOVIENO et al., 2010; THOMAS et al., 2010).

Estudos relatam que MRAs internalizados por amebas podem apresentar uma maior virulência após essa exposição (CIRILLO et al., 1997, 1999). Ao passar pelo interior da ameba, esses microrganismos podem expressar genes que proporcionam a adaptação no interior de macrófagos humanos, ou seja, quando ocorrer contato com essas células humanas, a infecção ocorre de forma facilitada (TOSETTI; CROXATTO; GREUB, 2014; BALCZUN; SCHEID, 2017).

Devido ao fato de amebas do gênero *Acanthamoeba* servirem de importante reservatório de bactérias, fungos, vírus e protozoários, essas são também conhecidas como “Cavalo de Tróia” do mundo microbiano. Vários trabalhos relatam as amebas como veículos de microrganismos patogênicos, portanto estudos neste sentido são de interesse ambiental e clínico (SIDDIQUI; SAGHEER; KHAN, 2013; SCHEID, 2014).

Dentre as bactérias patogênicas que podem ser encontradas no interior de *Acanthamoeba* spp. estão: *Acinetobacter baumannii* (CATEAU et al., 2011), *Afpia felis* (LA SCOLA; RAULT, 1999),

Burkholderia cepacia (LAMOTHE; THYSSEN; VALVANO, 2004), *Campylobacter jejuni* (SNELLING, 2005), *Coxiella burnetii* (LA SCOLA; RAOULT, 2001), *E. coli* O157 (BARKER; HUMPHREY; BROWN, 1999), *Francisella tularensis* (ABD et al., 2003), *Helicobacter pylori* (WINIECKA-KRUSNELL et al., 2002), *Klebsiella pneumoniae* (PAGNIER; RAOULT; LA SCOLA, 2008), *Legionella pneumophila* (CIRILLO; FALKOW; TOMPKINS, 1994), *Listeria monocytogenes* (HUWS et al., 2008), *Mycobacterium* spp. (DRANCOURT; ADÉKAMBI; RAOULT, 2007), *Pseudomonas aeruginosa* (MICHEL; BURGHARDT; BERGMANN, 1995), *Staphylococcus aureus* (HUWS et al., 2008), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (DE SOUZA et al., 2017), *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae* (SAEED et al., 2009), *Vibrio cholerae* (SHANAN et al., 2011), dentre outras.

Acanthamoeba spp. também têm sido relacionada como uma possível fonte de reserva de material genético, tal como plasmídeos de resistência, permitindo a transferência gênica entre bactérias presentes no interior amebiano, favorecendo o surgimento e seleção de bactérias resistentes a antimicrobianos (SAISONKORH et al., 2010; BERTELLI; GREUB, 2012).

Além de servir de reservatório para bactérias, espécies de *Acanthamoeba* podem abrigar fungos, vírus e protozoários em seu interior (THOMAS et al., 2010). Dentre os fungos e leveduras relatados como hospedeiros amebianos estão *Aspergillus fumigatus* (WAEYENBERGHE et al., 2013), *Blastomyces dermatitidis* (STEENBERGEN et al., 2004), *Cryptococcus neoformans* (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001), *Exophiala dermatitidis* (CATEAU et al., 2009), *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* (STEENBERGEN et al., 2004) e *Fusarium solani* (NUNES et al., 2016).

Dentre os vírus descritos como intracelulares de *Acanthamoeba* estão: adenovírus, coxsackievirus, enchovirus, enterovírus, mimivírus, poliovírus e vírus da estomatite vesicular (SIDDIQUI; SAGHEER; KHAN, 2013). Quanto aos protozoários, *Cryptosporidium parvum* e *Toxoplasma gondii* estão entre os hóspedes destas amebas (WINIECKA-KRUSNELL et al., 2009; SCHEID; SCHWARZENBERGER, 2011).

2.6 *Acanthamoeba* spp. E SUA RELAÇÃO COM A QUALIDADE DO AR EM AMBIENTES INTERNOS

Os aparelhos de ar condicionado são utilizados principalmente com a finalidade de proporcionar conforto térmico às pessoas em ambientes internos (DA SILVA et al., 2013). Entretanto, problemas de saúde relacionados a qualidade do ar têm sido descritos com frequência nos últimos anos (QUADROS et al., 2009). A troca do ar nesses ambientes nem sempre ocorre de forma satisfatória o que pode favorecer o desenvolvimento de microorganismos, que eventualmente podem acometer seres humanos causando infecções (GRAUDENZ; DANTAS et al., 2007). O controle da qualidade do ar interno desempenha um papel importante na prevenção de infecções nestes locais (LEUNG; CHAN, 2006).

Os sistemas de ar condicionado podem abrigar bactérias, fungos, vírus e protozoários, como *Acanthamoeba* spp. (ETCHEBEHERE et al., 2005; OOI et al., 2017). Esses microrganismos podem permanecer nestes locais por longo tempo e serem dispersos no ambiente através de correntes de ar (DA SILVA et al., 2013). Neste contexto, o estudo de microorganismos em aparelhos de ar condicionado faz-se especialmente importante em ambientes hospitalares, pois neste locais encontram-se indivíduos imunocomprometidos, os quais são mais suscetíveis a infecções (LEUNG; CHAN, 2006).

Alguns trabalhos relatam infecções associadas a falta de controle da qualidade do ar em ambientes hospitalares. Surtos de endocardite causados por *Aspergillus* sp. mostraram-se associados a contaminação de esporos deste fungo provenientes de filtros de sistemas de climatização (ETCHEBEHERE et al., 2005). Casos de pneumonia por *Legionella pneumophila* têm sido atribuídos a sistemas de refrigeração hospitalares que se apresentavam contaminados com esta bactéria (OSAWA et al., 2014; WEISS et al., 2017).

Em estudo realizado em um hospital universitário na Etiópia verificou a presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em amostras de ar, e destacou a possibilidade destas bactérias causarem infecções hospitalares graves (SOLOMON et al., 2017). Na Arábia Saudita, uma investigação realizada em um grande hospital local destacou a presença de alta quantidade de fungos dos gêneros *Cladosporium* e *Penicillium*, sendo superiores ao que é indicado nas diretrizes de qualidade do ar (EL-SHARKAWY; NOWEIR, 2014). No Brasil, um estudo feito no Piauí avaliou a presença da microbiota fúngica em aparelhos de ar condicionado de unidades de terapia intensiva de hospitais

públicos e privados. Os resultados revelaram elevada frequência de isolamento de *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma koningii* e *Aspergillus flavus*. Os autores enfatizam que todas as espécies isoladas no estudo eram patogênicas, o que poderia agravar o estado de saúde dos pacientes hospitalizados. Salientando também que a limpeza dos aparelhos de ar condicionado deve ser realizada quinzenalmente (MOBIN; SALMITO, 2006).

Existem, no Brasil, normas reguladoras da qualidade do ar interno. Dentre elas, a Resolução – RE nº 9, de 16 de janeiro de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a qual estabelece padrões referenciais de qualidade do ar interior em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo. A periodicidade de limpeza e manutenção de equipamentos compostos por unidades filtrantes definida pela ANVISA é mensal ou quando o filtro for descartável até sua obliteração (máximo 3 meses). Além disso, essa resolução lista as possíveis fontes de poluentes biológicos, inclusive protozoários e as principais medidas para controle destes no ambiente interno (BRASIL, 2003). Existe também uma norma brasileira (NBR) da Associação Brasileira de Normas Técnicas, NBR 7256, que aborda sobre o tratamento de ar em estabelecimentos assistenciais de saúde, no que diz respeito aos requisitos para projeto e execução das instalações (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2005).

Recentemente no Brasil, foi sancionada uma a Lei nº 13.589, de janeiro de 2018 que dispõe sobre a manutenção de instalações e equipamentos de sistemas de climatização de ambientes, nesta consta que todos os edifícios de uso público e coletivo que possuem ambientes climatizados artificialmente devem dispor de um plano de manutenção, operação e controle desses sistemas, visando à eliminação ou minimização de riscos potenciais à saúde dos ocupantes (BRASIL, 2018).

A Sociedade Americana de Engenheiros de Aquecimento, Refrigeração e Ar Condicionado dos Estados Unidos estabelece padrões para pesquisa de contaminantes químicos do ar em ambientes internos, entretanto padrões para contaminantes biológicos não são bem definidos nestas publicações (THE AMERICAN SOCIETY OF HEATING, REFRIGERATING AND AIR- CONDITIONING ENGINEERS, 2016).

A Organização Mundial da Saúde tem mostrado preocupação com qualidade do ar interior, reconhecem que embora as diretrizes apontam objetivos para gerenciamento da qualidade do ar interno, estas não fornecem instruções para que os objetivos sejam alcançados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Apesar da existência dessas normas, observa-se que nem sempre estas são adotadas e se percebe uma grande dificuldade em manter a qualidade do ar interno em ambientes hospitalares (MOTA et al., 2014).

A qualidade do ar em ambientes hospitalares está relacionada com a adequada manutenção e limpeza dos sistemas de condicionamento de ar, pois podem servir de fontes para a formação de biofilmes microbianos, como também desencadear o processo de disseminação de patógenos (LEUNG; CHAN, 2006). Devido à natureza oportunista de *Acanthamoeba* spp. e seu possível papel como reservatório de patógenos, o monitoramento deste protozoário em ambientes hospitalares torna-se importante e poderá ser utilizado como biomarcador de qualidade do ar em hospitais (CHAN et al., 2011; OOI et al., 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar *Acanthamoeba* spp. isoladas de amostras de poeira de aparelhos de ar-condicionado de um hospital público de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, bem como investigar microrganismos resistentes às amebas nos isolados de *Acanthamoeba* spp.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a identificação molecular dos isolados de *Acanthamoeba* spp.;
- Determinar o genótipo dos isolados de *Acanthamoeba* spp.;
- Avaliar o potencial patogênico dos isolados de *Acanthamoeba* spp. por meio de ensaios de osmotolerância e termotolerância;
- Detectar a presença de *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus* como microrganismos resistentes às amebas nos isolados de *Acanthamoeba* spp.

4. METODOLOGIA

4.1 ISOLADOS DE *Acanthamoeba* spp.

Os isolados de *Acanthamoeba* spp. incluídos neste estudo foram obtidos previamente de amostras de poeiras coletadas de distintos equipamentos de condicionadores de ar de diversos ambientes de um hospital público de Florianópolis, Santa Catarina e identificados morfológicamente como descrito por Macedo (2016). As amostras de poeira foram coletadas dos aparelhos de ar condicionado no período de março de 2014 a março de 2015 e fazem parte do banco de isolados do Laboratório de Estudos de Protozoários Emergentes e Oportunistas (LAPEO). As amostras foram obtidas dos seguintes ambientes do hospital: Centro ambulatorial cirúrgico, Centro cirúrgico, Centro obstétrico, Clínica cirúrgica I e II, Clínica Médica I e II, Emergência, Esterilização, Ginecologia, Hemodiálise, Oftalmologia, Pediatria, Quimioterapia e Unidade de Terapia Intensiva. Para os aparelhos de ar condicionado dos tipos Janela, *Split* e *Split* teto, as amostras de poeira foram coletadas dos filtros e em alguns casos também das aletas, sendo analisadas individualmente como amostras distintas, aleta e filtro. Para os ambientes refrigerados por ar condicionado central do tipo expansão indireta, as coletas de poeira foram feitas do conjunto grelha/difusor de saída do ar e/ou de filtros centrais. No estudo realizado por Macedo (2016), 42 isolados amebianos foram obtidos, sendo que 3 (7,2%) não foram capazes de se desenvolver em meio axênico, desta forma obteve-se 39 (92,9%) isolados axênicos de *Acanthamoeba* spp. que foram incluídos no presente estudo (APÊNDICE A).

4.2 CEPAS CONTROLE

As cepas controle utilizadas foram: *A. castellanii* Neff (ATCC 30010), *E. coli* (ATCC 25922), *L. pneumophila* SG 1 (NCTC 11821), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *S. aureus* (ATCC 25923) e um isolado de *K. pneumoniae* sensível a antimicrobianos, previamente identificado no setor de microbiologia da divisão de Análises Clínicas do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago

4.3 CULTIVO AXÊNICO DOS ISOLADOS

Os isolados de *Acanthamoeba* spp. foram mantidos axênicos, cultivados em meio líquido proteose peptona, extrato de levedo e glicose - PYG (NEFF, 1957) (ANEXO A), suplementado com penicilina G (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Os frascos foram incubados a 30 °C em estufa bacteriológica. Quando necessário, subcultivos para novos tubos contendo PYG com antibióticos foram realizados. Para o estudo de bactérias resistentes a amebas, subcultivos na 3ª passagem foram utilizados para extração de DNA total.

4.4 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DOS ISOLADOS DE *Acanthamoeba* spp.

Cultivos axênicos dos isolados contendo trofozoítos em fase logarítmica foram centrifugados a 500 x g durante 5 minutos. O sobrenadante obtido foi descartado e o sedimento foi lavado com 3 mL de tampão fosfato salino (PBS). Posteriormente foi realizada contagem em câmara de Fuchs-Rosenthal e 1×10^6 trofozoítos de cada isolado foram suspensos em 200 µL de PBS. A suspensão obtida foi submetida ao protocolo de extração de DNA (Protocolo para cultura de células) do kit comercial QIAamp DNA Mini Kit® (QIAGEN, Hilden, Germany), conforme instruções do fabricante.

A quantificação do DNA extraído foi realizada utilizando o equipamento Espectrofotômetro NanoVue® PLUS (GE Healthcare, EUA).

4.5 CONFIRMAÇÃO DO GÊNERO *Acanthamoeba* POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Com a finalidade de confirmar se todos os isolados caracterizados previamente por critérios morfológicos (MACEDO, 2016) pertenciam ao gênero *Acanthamoeba*, realizou-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) como descrito por Schroeder et al. (2001), com algumas alterações. Os iniciadores gênero-específico JDP1 (*Senso*) – 5'-GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA-3' e JDP2 (*Antissenso*) – 5'-TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA-3' foram utilizados para amplificação da região ASA.S1 do 18S rDNA do gênero *Acanthamoeba*. O produto de amplificação esperado varia de 423-551 pb dependendo do genótipo amebiano.

A reação foi realizada com volume final de 25 μ L, contendo aproximadamente 40 ng do DNA molde, tampão 1X (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 4,0 mM $MgCl_2$, 0,4 mM de cada iniciador o, 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP), 1U de *Platinum*[®] Taq DNA polimerase (Invitrogen) e água estéril para completar o volume final da reação. Foi utilizado o termociclador 2720 (Applied Biosystems, EUA), programado para desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 59 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, com extensão final de 72 °C por 5 minutos.

O controle negativo incluiu todos os reagentes e como substituto do DNA molde foi adicionado água para completar o volume da reação. Como controle positivo foi utilizado o DNA da cepa *A. castellanii* Neff (ATCC 30010).

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (80V/40') e corados com brometo de etídeo (1 μ g/mL). O marcador de tamanho molecular de 100 pb (Ladder, Ludwig Biotec, Brasil) foi utilizado para comparar o tamanho dos fragmentos obtidos. Os géis foram visualizados e fotografados sob iluminação ultravioleta utilizando o sistema de fotodocumentação ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare, EUA).

4.6 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS FRAGMENTOS DO 18S rDNA de *Acanthamoeba* spp.

Os produtos obtidos a partir da PCR do fragmento ASA.S1 do 18S rDNA de *Acanthamoeba* spp. foram purificados utilizando o kit comercial *PureLink*[®] PCR Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad USA). A quantidade de DNA (ng/mL) foi estimada através da intensidade de banda, por comparação visual empregando o padrão de tamanho molecular e massa (*Low DNA Mass Ladder*, Invitrogen).

O sequenciamento dos produtos purificados foi realizado no sequenciador automático ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, EUA) utilizando o kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, EUA), no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz, Minas Gerais. Os dados obtidos a partir do sequenciamento foram analisados, corrigidos e alinhados empregando o programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versão 7.0.

Para determinação dos genótipos, os dados obtidos a partir do sequenciamento foram comparados com as sequências nucleotídicas de

Acanthamoeba spp. disponíveis na base de dados *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). A maior porcentagem de similaridade entre as sequências obtidas e as depositadas no *GenBank* foram consideradas para classificação dos genótipos.

4.7 ESTUDO DA PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE *Acanthamoeba* spp. POR PARÂMETROS FISIOLÓGICOS: OSMOTOLERÂNCIA E TERMOTOLERÂNCIA

4.7.1 Osmotolerância

Com o propósito de avaliar a influência de um meio hiperosmolar sobre o crescimento de trofozoítos dos isolados de *Acanthamoeba* spp., placas bacteriológicas contendo ágar não-nutritivo (ANN) 1,5% (ANEXO B) acrescidas com 1 M de manitol cobertas com suspensão de *E. coli* (ATCC 25922) foram utilizadas. Placas sob as mesmas condições, entretanto sem adição de manitol foram utilizadas como controle de crescimento. O local de inoculação foi demarcado previamente, onde foram realizados os inóculos. Cerca de 1000 trofozoítos foram inoculados nos locais demarcados (inóculo de 20 µL). As placas foram posteriormente seladas com Parafilm® e incubadas a 30 °C por 10 dias. O crescimento dos trofozoítos foi determinado por contagem de número de cistos e trofozoítos, a uma distância aproximada de 20 mm do ponto de inoculação. Para cada inóculo, cinco campos microscópicos foram quantificados (microscópio óptico, aumento de 100x). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. As quantificações foram realizadas no décimo dia de incubação. Posterior a esta etapa, áreas das placas dos isolados submetidos ao meio hiperosmolar foram transferidas para placas contendo ANN 1,5% recobertas com *E. coli* e incubadas a 30 °C para avaliar a viabilidade dos isolados (Caumo et al., 2009).

4.7.2 Termotolerância

Com a finalidade de avaliar se a temperatura elevada teria influência sobre o crescimento de trofozoítos dos isolados de *Acanthamoeba* spp., placas bacteriológicas contendo ANN 1,5% cobertas com suspensão de *E. coli* (ATCC 25922) foram utilizadas. O local de inoculação foi demarcado previamente, onde foram realizados os inóculos. Cerca de 1000 trofozoítos foram inoculados nos locais

demarcados (inóculo de 20 µL). As placas foram posteriormente seladas com Parafilm® e incubadas a 30 °C e 40 °C por 10 dias. As placas submetidas a temperatura de 30 °C foram utilizadas como controle. O crescimento dos trofozoítos foi determinado por contagem do número de cistos e trofozoítos a uma distância aproximada de 20 mm do ponto de inoculação. Para cada inóculo, cinco campos microscópicos foram quantificados (microscópio óptico, aumento de 100x). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A quantificação foi realizada no décimo dia de incubação. Posterior a esta etapa, áreas das placas dos isolados submetidos a temperatura de 40 °C foram transferidas para placas contendo ANN 1,5% cobertas com *E. coli* e incubadas a 30 °C para avaliar a viabilidade dos isolados (Caumo et al., 2009).

Os isolados foram classificados em três grupos de acordo com o crescimento nos testes de tolerância. Isolados foram considerados patogênicos quando apresentaram crescimento concomitante em meio hiperosmolar (1M de manitol) e a temperatura elevada de 40 °C. Isolados que se desenvolveram em apenas um dos testes (40 °C ou em meio hiperosmolar) foram classificados com patogenicidade intermediária e isolados que não apresentaram crescimento a 1 M de manitol e a 40 °C foram considerados isolados não-patogênicos.

4.8 PESQUISA DE MICRORGANISMOS RESISTENTES ÀS AMEBAS

4.8.1 Investigação da presença de microrganismos resistentes às amebas por microscopia

Com o propósito de verificar a presença de microrganismos resistentes às amebas (MRAs) no interior dos isolados estudados, inicialmente foram preparadas lâminas a fresco de trofozoítos e cistos dos isolados amebianos. Para isso foram utilizados subcultivos dos isolados em 3ª passagem. A análise foi feita em microscopia de contraste de fase (aumento de 1000x).

4.8.2 Extração de DNA por lise térmica de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e de um isolado de *K. pneumoniae* sensível a antimicrobianos

As cepas e isolado de bactérias foram cultivados em placas bacteriológicas contendo meio ágar MacConkey ou Ágar sangue (de acordo com a exigência nutricional do microrganismo cultivado) e incubadas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, as colônias foram sutilmente raspadas das placas com alça bacteriológica estéril e colocadas em microtubos de 1,5 mL contendo cerca de 1 mL de PBS, até a obtenção de uma suspensão bacteriana bem turva. Após, os microtubos contendo a suspensão bacteriana foram submetidos à lise térmica a 100 °C por 15 minutos e foram centrifugados a 20817 x g por 1 minuto. Por fim, parte do sobrenadante (cerca de 350 µL) foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e o DNA obtido foi utilizado como controle positivo nas PCRs.

A quantificação do DNA extraído foi realizada utilizando o equipamento Espectrofotômetro NanoVue® PLUS (GE Healthcare, EUA).

4.8.3 Investigação da presença de *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* spp. e *Staphylococcus aureus* nos isolados de *Acanthamoeba* spp.

A presença de *K. pneumoniae*, *Pseudomonas* spp. e *S. aureus* como MRAs foi investigada nos isolados de *Acanthamoeba* spp. por PCR convencional. Iniciadores específicos para gênero ou espécie foram utilizados, conforme exposto no Quadro 2. A reação foi feita com volume final de 25 µL, contendo aproximadamente 100 ng do DNA total obtido dos isolados amebianos, tampão 1X (*Green GoTaq® Flexi Buffer* pH 8,5), MgCl₂ (Quadro 2), 0,4 mM de cada iniciador, 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP), 1U de *GoTaq® Hot Start Polymerase* (Promega, EUA) e água estéril para completar o volume final da reação. Foi utilizado o termociclador 2720 (*Applied Biosystems*, EUA), programado com base nas referências utilizadas (Quadro 2), com algumas alterações na temperatura de anelamento quando necessário e aumento na quantidade de ciclos.

O controle negativo incluiu todos os reagentes e como substituto do DNA molde foi adicionado água para completar o volume da reação. Como controle positivo foi utilizado o DNA da cepa/isolado controle, correspondente à bactéria pesquisada na reação.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (80V/45^o) e corados por brometo de etídeo (1µg/mL). O marcador de tamanho molecular de 100 pb (Ladder, Ludwig Biotec, Brasil) foi utilizado para comparar o tamanho dos fragmentos obtidos. Os géis foram visualizados e fotografados sob iluminação ultravioleta utilizando o sistema de fotodocumentação ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare, EUA).

Quadro 2. Informações sobre os iniciadores utilizados para a investigação de microrganismos resistentes às amebas por reação em cadeia da polimerase

Iniciadores	Sequência 5' - 3'	Tamanho do produto	Concentração de MgCl₂	Temperatura de anelamento	Referência
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kp-Pf (<i>Senso</i>) 5'-ATTTGAAGAGGTTGCAAACGAT-3' Kp-Pr2 (<i>Antissenso</i>) 5'-CCGAAGATGTTTCACTTCTGATT-3'	260 pb	2,0 mM	57 °C	Liu et al., 2008 Adaptado
<i>Pseudomonas</i> spp.	PA-GS-F (<i>Senso</i>) 5'-GACGGGTGAGTAATGCCTA-3' PA-GS-R (<i>Antissenso</i>) 5'-CACTGGTGTTCCTTCCTATA-3'	618 pb	2,0 mM	56 °C	Spilker et al., 2004 Adaptado
<i>Staphylococcus aureus</i>	au-F3 (<i>Senso</i>) 5'-TCGCTTGCTATGATTGTGG-3' au-nucR (<i>Antissenso</i>) 5'-GCCAATGTTCTACCATAGC-3'	359 pb	2,5 mM	52 °C	Sasaki et al., 2010 Adaptado

Fonte: A autora.

4.8.4 Investigação da presença de *Legionella* spp. nos isolados de *Acanthamoeba* spp.

A presença de *Legionella* spp. como MRAs foi investigada nos isolados de *Acanthamoeba* spp. por semi-nested PCR como descrito por Magnet et al. (2015). Essa etapa do estudo foi realizada no Laboratório de Diagnóstico Imunológico e Molecular de Doenças Infecciosas, Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os seguintes iniciadores gênero-específicos foram utilizados:

- LEG 225 5´- AAGATTAGCCTGCGTCCGAT-3´
- LEG 858 5´- GTCAACTTATCGCGTTTGCT-3´
- LEG 448 5´- GAGGGTTGATAGGTTAAGAGC-3´

A primeira reação que compõe a semi-nested PCR consistiu de uma PCR convencional, feita com volume final de 50 µL contendo aproximadamente 70 ng do DNA total obtido dos isolados amebianos, 25 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega, EUA), 0,2 mM de cada iniciador (LEG 225 e LEG 858) e água estéril para completar o volume final da reação. O termociclador foi programado para desnaturação inicial de 95 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 62 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto, com extensão final de 72 °C por 10 minutos. O produto de amplificação esperado nesta primeira reação é de 654 pb. A segunda reação da semi-nested PCR consistiu de uma PCR em tempo real, a qual foi feita com volume final de 20 µL, contendo 1 µL do produto da PCR anterior, 10 µL de Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen) 0,2 mM de cada iniciador (LEG 448 e LEG 858) e água estéril para completar o volume final da reação. O termociclador foi programado para desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 62 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto, com extensão final de 72 °C por 10 minutos.

O controle negativo incluiu todos os reagentes e como substituto do DNA molde foi adicionado água para completar o volume da reação. Como controle positivo foi utilizado o DNA da cepa *L. pneumophila* SG 1 (NCTC 11821).

Os produtos amplificados na primeira reação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% (80V/45´) e corados por brometo de etídeo (1µg/mL). O marcador de tamanho molecular de 100 pb (Ladder, Ludwig Biotec, Brasil) foi utilizado para comparar o tamanho dos fragmentos obtidos. Os géis foram visualizados e fotografados sob

iluminação ultravioleta. Na segunda reação, a positividade foi avaliada verificando o *Cycle threshold* (Ct) e a curva de dissociação dos iniciadores.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO DE DNA E CONFIRMAÇÃO DO GÊNERO *Acanthamoeba* POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

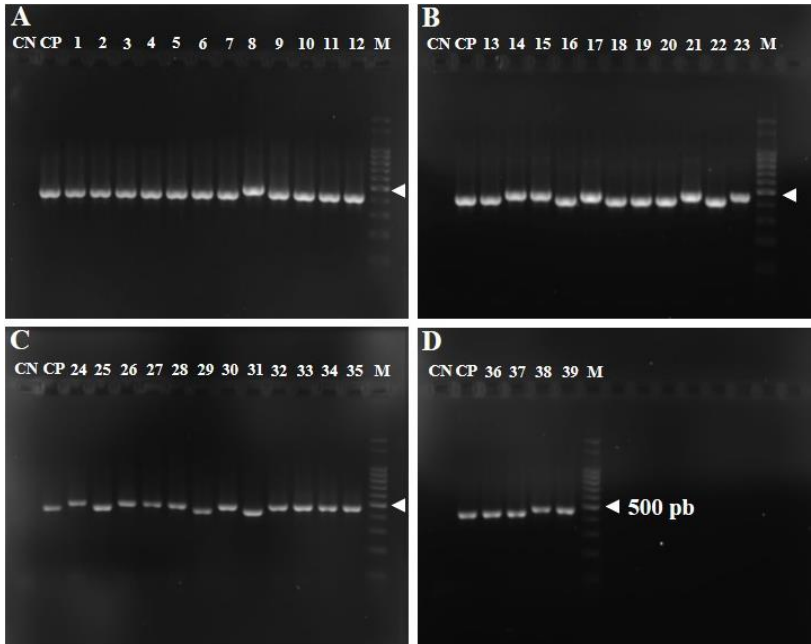
O rendimento obtido a partir da extração de DNA total dos isolados amebianos foi em média 60 ng/ μ L, variando de 25,5 a 178 ng/ μ L.

Os 39 isolados de *Acanthamoeba* spp. identificados previamente por critérios morfológicos (MACEDO, 2016) foram confirmados como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* pela técnica de PCR convencional. O produto de amplificação esperado de aproximadamente 500 pb foi observado em todos os isolados amebianos (Figura 3).

Métodos moleculares para detecção de *Acanthamoeba* spp. são cada vez mais utilizados pela alta sensibilidade e especificidade quando comparados à cultura, justificando o emprego dessas metodologias como suporte no diagnóstico de infecções humanas e também na identificação do gênero amebiano em amostras ambientais (VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007; CARNT; STAPLETON, 2016; LASS et al., 2017).

A PCR empregando iniciadores que amplificam uma região conservada do gene 18S rDNA é a técnica mais empregada e aceita nos trabalhos de isolamento e caracterização de isolados de *Acanthamoeba*, servindo de confirmação para a caracterização morfológica (SCHROEDER et al., 2001; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015). O sequenciamento do fragmento obtido na PCR permite a determinação do genótipo por comparação da similaridade com sequências depositadas no *GenBank* (FUERST; BOOTON; CRARYB, 2015).

Figura 3. Produtos de amplificação obtidos por reação em cadeia da polimerase do fragmento ASA.S1 do gene 18S rDNA de *Acanthamoeba* spp.



(A, B, C, D) – (CN) Controle negativo, (CP) Controle positivo – *A. castellanii* (ATCC 30010), (1-39) Isolados de *Acanthamoeba* spp. de diferentes ambientes hospitalares, (M) Marcador de tamanho molecular de 100 pb. Seta branca indica o tamanho do produto de amplificação esperado de aproximadamente 500 pb.
Fonte: A autora.

Um estudo realizado por Mathers et al. (2000), após sucessivas diluições do DNA total purificado de *Acanthamoeba*, constatou que o produto de PCR foi detectável a uma concentração de 5×10^{-4} ng/mL. Além disso, microrganismos do gênero *Acanthamoeba* inteiros foram testados a fim de avaliar a quantidade necessária destes em uma amostra para que a reação fosse positiva. Os resultados demonstraram sensibilidade de 90% em soluções contendo cerca de 1 a 5 microrganismos em 10 μ L, apontando uma sensibilidade próxima a detecção de um único microrganismo.

Neste estudo os isolados axênicos se mostraram positivos na PCR, indicando que todos apresentavam quantidades suficientes de DNA e uma boa qualidade do mesmo.

5.3 CLASSIFICAÇÃO GENOTÍPICA DE *Acanthamoeba* spp.

Os produtos de amplificação da PCR de *Acanthamoeba* spp. foram purificados e submetidos ao sequenciamento. As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no *GenBank*, sendo que todas apresentaram similaridade igual ou superior a 97% quando comparadas com as sequências de referência. Os resultados revelaram que 19 (48,7%) isolados pertenciam ao genótipo T4, 16 (41,0%) ao genótipo T5 e 4 (10,3%) ao genótipo T11 (Tabela 1).

Os três genótipos de *Acanthamoeba* spp. identificados neste estudo (T4, T5, T11) possuem ampla distribuição ambiental, com relatos de isolamento destes a partir de amostras de solo (ROGERSON et al., 2004; TODD et al., 2014; REYES-BATLLE et al. 2016;), água (ROGERSON et al., 2004; CAUMO; ROTT, 2011; SENTE et al., 2016) e poeira (NIYYATI et al., 2009).

A prevalência do genótipo T4 em amostras ambientais encontrada neste trabalho também foi evidenciada em outros estudos. Rahdar et al. (2012) verificaram o predomínio deste genótipo em isolados obtidos de solo e água de uma província do Irã. Da mesma forma, Geisen et al. (2014) relataram o predomínio do genótipo T4 em isolados de *Acanthamoeba* oriundos de amostras de solo de três locais distintos, Holanda, Sardenha e Tibete. Este genótipo é o mais associado a casos de ceratite e encefalite amebiana, bem como as demais infecções oportunistas causadas por este protozoário (WALIA et al., 2007; AICHELBURG et al., 2008; SIDDIQUI; KHAN, 2012).

O genótipo T5 foi o segundo mais encontrado, o que está de acordo com dados descritos na literatura. No estudo de Booton et al. (2005) que incluiu 200 isolados de *Acanthamoeba*, este genótipo foi identificado como o segundo mais prevalente entre os isolados ambientais, da mesma forma apresentou-se como segundo no estudo de Ledee et al. (2009) que incluiu isolados de ceratite amebiana. O genótipo T5 está associado a casos de ceratite e encefalite amebiana (SIDDIQUI; KHAN, 2012).

O genótipo T11 verificado em menor proporção neste estudo (10,3%) está relacionado a casos de ceratite amebiana (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNICK, 2015). Este foi um dos genótipos descritos como causador desta infecção em uma grande pesquisa realizada na Áustria que incluiu casos de infecções por *Acanthamoeba* nos últimos 20 anos (WALOCHNIK; SCHEIKL; HALLER-SCHÖBER, 2014).

Tabela 1. Caracterização genotípica de isolados acantamebianos obtidos a partir da poeira de aparelhos de ar condicionado de um hospital público de Florianópolis, SC (continua)

ISOLADOS	ACESSO GENBANK	GENÓTIPO	SEQUÊNCIAS DE REFERÊNCIA	
			ACESSO GENBANK	% DE SIMILARIDADE
CAC - Consultório 01 F	MF076639	T4	KF733253	97%
CAC - Consultório 04 F	MF076634	T4	KT735332	100%
CC - Sala 01 G/D	MF076645	T4	U07409	98%
CC - Sala 02 G/D	MF076650	T4	KF733253	98%
CC - Sala 04 G/D	MF076662	T5	KF962049	100%
CO - Centro obstétrico FC	MF076637	T4	U07409	97%
CCI - Leito 406 G/D	MF076635	T5	KF962049	100%
CCI - Leito 410 G/D	MF076640	T5	KF962049	100%
CCI - Sala de procedimentos G/D	MF076656	T4	KT735332	100%
CCII - Sala de curativos G/D	MF076658	T5	KF962049	100%
CMI - 309F	MF076659	T4	U07409	99%
CMI - 310A	MF076661	T5	KF962049	100%
CMI - 310F	MF076643	T4	KF733263	100%
CMI - 311A	MF076651	T4	U07409	100%
CMI - 311F	MF076632	T4	KF733263	100%
CMI - Clínica médica I FC	MF076657	T11	KT892890	99%
CMII - 314 A	MF076644	T5	KF962049	100%
CMII 324 A	MF076631	T4	KF733263	100%
EMG - Ala direita F	MF076633	T5	KF962049	100%
EMG - Ala esquerda F	MF076649	T5	KF962049	100%
EMG - Sala de reanimação F	MF076653	T5	KF962049	99%

Tabela 1. Caracterização genotípica de isolados acantamebianos obtidos a partir da poeira de aparelhos de ar condicionado de um hospital público de Florianópolis, SC (conclusão)

ISOLADOS	ACESSO GENBANK	GENÓTIPO	SEQUÊNCIAS DE REFERÊNCIA	
			ACESSO GENBANK	% DE SIMILARIDADE
EST - Arsenal F	MF076663	T5	KF962049	100%
EST - Sala de preparo F	MF076652	T4	KF733253	99%
GIN - Quarto 202 A	MF076647	T4	U07409	98%
GIN - Quarto 202 F	MF076664	T5	KF962049	100%
GIN - Consultório 02A	MF076638	T4	U07409	98%
GIN - Consultório 02F	MF076665	T5	KF962049	100%
HEM - Sala de procedimentos central 1 G/D	MF076660	T11	KT892890	99%
HEM - Sala de procedimentos central 2 G/D	MF076648	T11	KT892890	99%
HEM - Sala de repouso F	MF076655	T5	KF962049	100%
OFT - Sala de espera F	MF076630	T4	KF733253	99%
OFT - Consultório 02 F	MF076628	T4	U07409	99%
PED - Sala de cuidados especiais A	MF076642	T4	U07409	99%
PED - Sala de cuidados especiais F	MF076654	T5	KF962049	100%
QT - Consultório 01G/D	MF076629	T5	KF962049	100%
QT - Consultório 02 G/D	MF076636	T4	U07409	98%
QT - Sala de procedimentos G/D	MF076641	T5	KF962049	100%
QT - Quimioterapia FC	MF076646	T4	KF733253	99%
UTI - Unidade de terapia intensiva FC	MF076666	T11	KF962049	99%

(CAC) Centro Ambulatorial Cirúrgico, (CC) Centro Cirúrgico, (CO) Centro Obstétrico, (CCI) Clínica Cirúrgica I, (CCII) Clínica Cirúrgica II, (CMI) Clínica Médica I, (CMII) Clínica Médica II, (EMG) Emergência, (EST) Esterilização, (GIN) Ginecologia, (HEM) Hemodiálise, (OFT) Oftalmologia, (PED) Pediatria, (QT) Quimioterapia, (UTI) Unidade de Terapia Intensiva. (A) Aleta, (F) Filtro, (FC) Filtro Central e (G/D) Grelha/Difusor. Fonte: A autora.

Trabalhos que avaliaram a presença de *Acanthamoeba* em amostras de poeira e solo evidenciaram resultados semelhantes ao presente estudo, relatando a presença dos genótipos T4, T5 e T11, com predomínio de isolamento do genótipo T4 (NIYYATI et al., 2009; TODD et al., 2014). Estudos de isolamento de *Acanthamoeba* a partir de aparelhos de ar condicionado têm sido realizados em alguns países como Chile (ASTORGA et al., 2011) e Malásia (CHAN et al., 2011), evidenciando a presença dos genótipos T3, T4, T5 e T11.

Existem poucos relatos de isolamento de *Acanthamoeba* em ambientes hospitalares, apesar da importância destes microrganismos como causadores de infecções oportunistas, bem como veículos e dispersores de patógenos (KOCAZEYBEK, 2015). Carlesso et al. (2010) descreveram a presença de *Acanthamoeba* do genótipo T4 em amostras de poeira e do genótipo T5 em amostras de biofilme, ambas provenientes de ambientes de um hospital de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Uma investigação realizada na Áustria quanto a presença de AVL e bactérias em sistemas de refrigeração, após um surto de legionelose em um hospital e seus arredores, relatou a presença de 9 isolados de *Acanthamoeba* pertencentes ao genótipo T4, os quais apresentavam bactérias resistentes às amebas em seu interior, enfatizando a importância dessas amebas como veículos bacterianos (SCHEIKL et al., 2016).

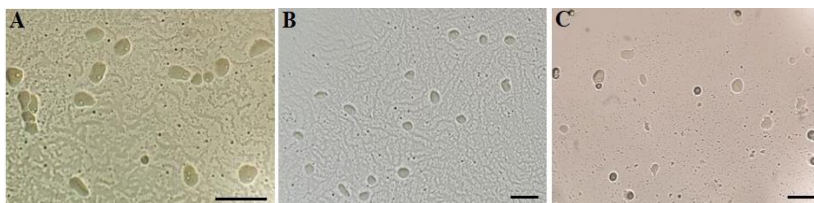
Todos os genótipos identificados no presente estudo (T4, T5 e T11) estão associados a casos de infecções humanas (SIDDIQUI; KHAN, 2012; WALOCHNIK; SCHEIL; HALLER-SCHOBBERB, 2014). Estes resultados merecem uma atenção especial da comunidade hospitalar, considerando o ambiente de isolamento e a característica de muitos pacientes em ambiente hospitalar, pois podem estar imunologicamente suscetíveis a infecções, bem como o caráter oportunista de *Acanthamoeba* spp.

5.4 ESTUDO DA PATOGENICIDADE DOS ISOLADOS DE *Acanthamoeba* POR PARÂMETROS FISIOLÓGICOS: OSMOTOLERÂNCIA E TERMOTOLERÂNCIA

O potencial patogênico dos 39 isolados de *Acanthamoeba* spp. do presente estudo, foi determinado por ensaios de osmotolerância e termotolerância, previamente estabelecidos por Caumo et al. (2009) (Tabela 2). A temperatura de 30 °C foi utilizada como controle de crescimento, pois é considerada a temperatura ótima para o desenvolvimento amebiano (NEFF, 1969).

Dos 39 isolados submetidos aos ensaios de osmo e termotolerância, 7 (18%) isolados foram considerados patogênicos, pois tiveram crescimento em meio hiperosmolar (1 M de manitol) e em temperatura elevada de 40 °C. Isolados que se desenvolveram somente a 40 °C, 25 (64,1%) isolados, e somente em meio hiperosmolar, 2 (5,2%) isolados, foram classificados com patogenicidade intermediária. Dentre os isolados, 5 (12,8%) não apresentaram crescimento a 1 M de manitol e a 40 °C e foram considerados isolados não-patogênicos. Na figura 4 é possível evidenciar como as amebas são visualizadas por microscopia óptica após crescimento ANN, sob diferentes condições no estudo do potencial patogênico.

Figura 4. Crescimento do isolado amebiano do setor de oftalmologia (filtro da sala de espera) no estudo do potencial patogênico



(A) Crescimento do isolado em ágar não nutricional (ANN) a 30 °C, (B) Crescimento do isolado em ANN contendo 1 M de manitol e (C) Crescimento do isolado a 40 °C. Barra= 40 μm. Fonte: A autora

Tabela 2. Estudo da patogenicidade de isolados de *Acanthamoeba* por parâmetros fisiológicos – osmotolerância e termotolerância.. (continua)

ISOLADOS	OSMOTOLERÂNCIA CRESCIMENTO 1M	TERMOTOLERÂNCIA CRESCIMENTO 40 °C	PATOGENICIDADE
CAC - Consultório 01 F	+	+++	Patogênico
CAC - Consultório 04 F	-	-	Não-patogênico
CC - Sala 01 G/D	-	+++	Patogenicidade intermediária
CC - Sala 02 G/D	-	++	Patogenicidade intermediária
CC - Sala 04 G/D	+++	++	Patogênico
CO - Centro obstétrico FC	-	-	Não-patogênico
CCI - Leito 406 G/D	++	+	Patogênico
CCI - Leito 410 G/D	-	++	Patogenicidade intermediária
CCI - Sala de procedimentos G/D	-	++	Patogenicidade intermediária
CCII - Sala de curativos G/D	+++	+++	Patogênico
CMI - 309F	-	++	Patogenicidade intermediária
CMI - 310A	-	+++	Patogenicidade intermediária
CMI - 310F	+	-	Patogenicidade intermediária
CMI - 311A	-	-	Não-patogênico
CMI - 311F	-	+++	Patogenicidade intermediária
CMI - Clínica médica I FC	-	-	Não-patogênico
CMII - 314 A	-	++	Patogenicidade intermediária
CMII - 324 A	+	-	Patogenicidade intermediária
EMG - Ala direita F	++	+++	Patogênico
EMG - Ala esquerda F	-	++	Patogenicidade intermediária
EMG - Sala de reanimação F	-	+++	Patogenicidade intermediária
EST - Arsenal F	-	++	Patogenicidade intermediária

Tabela 2. Estudo da patogenicidade de isolados de *Acanthamoeba* por parâmetros fisiológicos – osmotolerância e termotolerância..
(continuação)

ISOLADOS	OSMOTOLERÂNCIA CRESCIMENTO 1M	TERMOTOLERÂNCIA CRESCIMENTO 40 °C	PATOGENICIDADE
EST - Sala de preparo F	-	+++	Patogenicidade intermediária
GIN - Quarto 202 A	-	+	Patogenicidade intermediária
GIN - Quarto 202 F	-	-	Não-patogênico
GIN - Consultório 02A	-	+++	Patogenicidade intermediária
GIN - Consultório 02F	-	++	Patogenicidade intermediária
HEM - Sala de procedimentos central 1 G/D	-	+++	Patogenicidade intermediária
HEM - Sala de procedimentos central 2 G/D	-	++	Patogenicidade intermediária
HEM - Sala de repouso F	-	++	Patogenicidade intermediária
OFT - Sala de espera F	+++	++	Patogênico
OFT - Consultório 02 F	+++	+	Patogênico
PED - Sala de cuidados especiais A	-	+	Patogenicidade intermediária
PED - Sala de cuidados especiais F	-	+++	Patogenicidade intermediária
QT - Consultório 01G/D	-	+++	Patogenicidade intermediária
QT - Consultório 02 G/D	-	+++	Patogenicidade intermediária
QT - Sala de procedimentos G/D	-	+	Patogenicidade intermediária
QT - Quimioterapia FC	-	++	Patogenicidade intermediária

Tabela 2. Estudo da patogenicidade de isolados de *Acanthamoeba* por parâmetros fisiológicos – osmotolerância e termotolerância.. (conclusão)

ISOLADOS	OSMOTOLERÂNCIA CRESCIMENTO 1M	TERMOTOLERÂNCIA CRESCIMENTO 40 °C	PATOGENICIDADE
UTI - Unidade de terapia intensiva FC	-	+	Patogenicidade intermediária

(CAC) Centro Ambulatorial Cirúrgico, (CC) Centro Cirúrgico, (CO) Centro Obstétrico, (CCI) Clínica Cirúrgica I, (CCII) Clínica Cirúrgica II, (CMI) Clínica Médica I, (CMII) Clínica Médica II, (EMG) Emergência, (EST) Esterilização, (GIN) Ginecologia, (HEM) Hemodiálise, (OFT) Oftalmologia, (PED) Pediatria, (QT) Quimioterapia, (UTI) Unidade de Terapia Intensiva. (A) Aleta, (F) Filtro, (FC) Filtro Central e (G/D) Grelha/Difusor. (+) 1 a 15 cistos e/ou trofozoítos; (++) 16 a 30 cistos e/ou trofozoítos, e (+++) > cistos e/ou trofozoítos. (-) ausência de crescimento de *Acanthamoeba*. Avaliação feita em cinco campos microscópicos (100X). Critérios adaptados de Caumo et al. (2009). Fonte: A autora.

Esses ensaios são utilizados como marcadores de virulência amebiano, pois isolados capazes de se adaptar fisiologicamente e resistir a condições adversas, como crescimento em meio hiperosmolar e a temperaturas elevadas, são mais adaptados, e desta forma, podem exibir maior capacidade de causar infecções no homem e em outros animais (KHAN; JARROLL; PAGET, 2001).

A resistência do isolado à temperatura de 40 °C pode refletir a capacidade de desenvolvimento amebiano durante processos infecciosos, pois a resistência permite a sobrevivência da ameba a episódios de febre, o que caracteriza isolados mais virulentos (GRIFIN, 1972; KILIC et al., 2004; AL-HERRAWY et al., 2013). A avaliação do potencial patogênico dos isolados provenientes de ambiente hospitalar torna-se importante, pois é um fator de risco a ser considerado para pacientes imunologicamente debilitados.

Os isolados considerados patogênicos poderiam mais facilmente se adaptar aos tecidos do hospedeiro e causar infecção. Neste sentido, o isolado CCII - Sala de curativos G/D, por se desenvolver melhor frente a concentração de 1 M de manitol e a temperatura elevada (acima de 30 cistos e/ou trofozoítos por campo analisado), poder ser considerado o isolado mais virulento deste estudo.

Vários ensaios *in vitro* descritos na literatura já foram realizados com a finalidade de avaliar a patogenicidade de isolados de *Acanthamoeba* spp., entretanto ainda não existe um método padrão validado (WALOCHNIK; OBWALLER; ASPÖCK, 2000). Testes *in vitro* tem seu valor como testes preliminares para caracterização de patogenicidade, entretanto ensaios *in vivo* fazem-se necessários para confirmar essa caracterização (HAJIALILO et al., 2016).

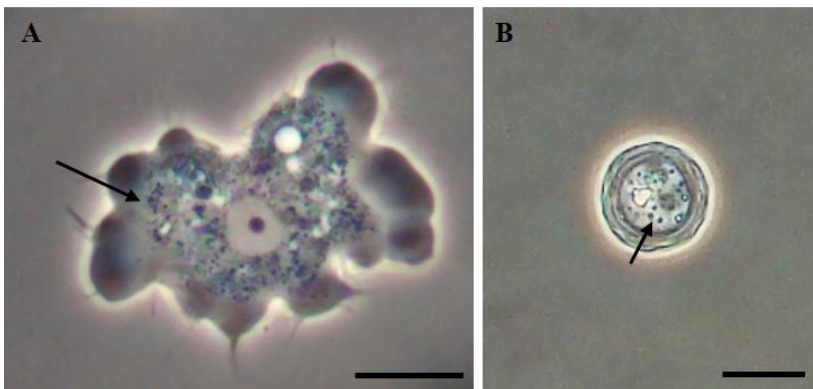
Apesar da maioria dos isolados não terem sido classificados como patogênicos, ainda assim estes apresentam importância epidemiológica significativa, pois podem servir de veículos e reservatórios de microrganismos patogênicos (KEBBI-BEGHDADI; GREUB, 2014; BALCZUN; SCHEID, 2017).

5.5 PESQUISA DE MICRORGANISMOS RESISTENTES ÀS AMEBAS

5.5.1 Investigação da presença de microrganismos resistentes às amebas por microscopia

Em todos os 39 isolados de *Acanthamoeba* spp. foi observado a presença de MRAs, por meio de microscopia de contraste de fase (Figura 5). Os mesmos isolados foram submetidos a investigação de MRAs por técnicas moleculares.

Figura 5. Presença de bactérias resistentes às amebas nos isolados amebianos visualizadas por meio de microscopia de contraste de fase



Setas pretas indicam bactérias presentes no interior de (A) trofozoíto do isolado CAC - Consultório 01 F e (B) cisto do isolado amebiano OFT - Sala de espera F. (CAC) Centro Ambulatorial Cirúrgico, (OFT) Oftalmologia e (F) Filtro. Barra= 10 µm. Fonte: A autora.

Fritsche, Sobek e Gautom (1998) ao avaliar o efeito citopático de *Acanthamoeba* contendo ou não bactérias em seu interior frente a fibroblastos, verificaram que amebas contendo MRAs apresentavam maior citopatogenicidade quando comparado aos controles (apenas amebas ou bactérias em contato com fibroblastos). Esses dados fornecem evidências de que bactérias presentes no interior amebiano são capazes de aumentar o potencial patogênico desses protozoários.

Alterações quanto à virulência também são observadas em MRAs, que podem exibir maior patogenicidade após passagem pelas amebas. *Mycobacterium avium* após internalização por *A. castellanii* apresentou

diminuição da suscetibilidade a antimicrobianos, tais como rifabutina, azitromicina e claritromicina (MILTNER; BERMUDEZ, 2000).

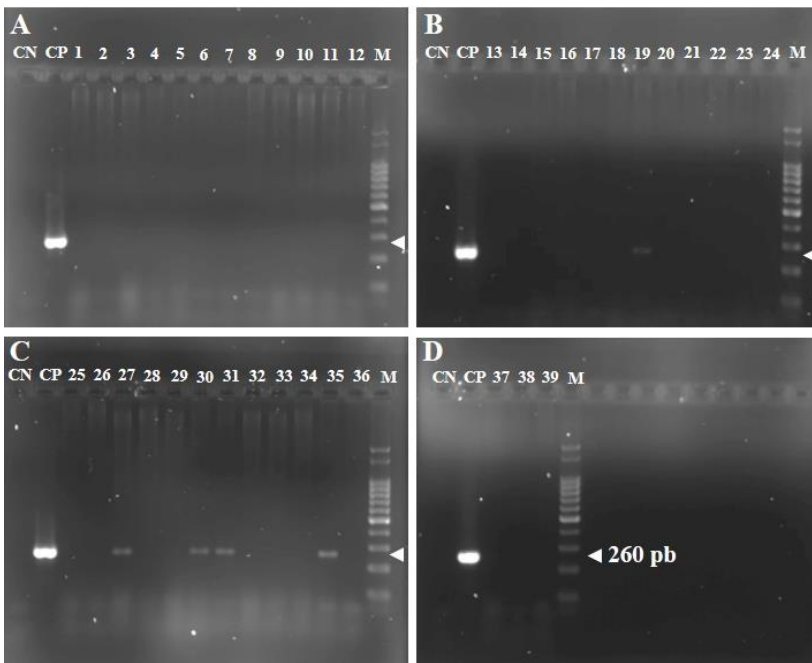
Devido a capacidade de *Acanthamoeba* spp. abrigar patógenos em seu interior, protegendo-os da ação de agentes externos, considera-se que estas amebas podem auxiliar na distribuição ambiental e na transmissão destes patógenos a hospedeiros susceptíveis (KHAN; SIDDIQUI, 2014). Do ponto de vista de saúde pública a presença de *Acanthamoeba* spp. especialmente em ambiente hospitalar é uma preocupação que não pode ser desconsiderada (BALCZUN; SCHEID, 2017).

5.5.2 Investigação da presença de *Klebsiella pneumoniae* em isolados de *Acanthamoeba* spp.

A investigação da presença de *K. pneumoniae* por PCR convencional, utilizando iniciadores espécie-específicos (LIU et al., 2008), permitiu à amplificação de DNA dessa bactéria em 5 (12,8%) dos 39 isolados acantamebianos. Os isolados de *Acanthamoeba* que apresentaram amplificação são provenientes dos seguintes ambientes do hospital: (19) Quimioterapia (QT - Quimioterapia FC), (27) Pediatria (PED - Sala de cuidados especiais F), (30) Clínica médica I (CMI - Clínica médica I FC), (31) Clínica cirúrgica II (CCII - Sala de curativos G/D) e (35) Centro cirúrgico (CC - Sala 04 G/D) (Figura 6).

Na literatura não foram encontrados relatos de investigação e identificação de *K. pneumoniae* a partir de isolados ambientais ou clínicos de *Acanthamoeba*. Entretanto, a capacidade de *K. pneumoniae* sobreviver no interior deste protozoário foi descrita em estudos de cocultivo com *A. castellanii* e *A. polyphaga*. Essa bactéria é capaz de permanecer no interior de *Acanthamoeba* sem causar lise amebiana (KING et al., 1988; PAGNIER; RAOULT; LA SCOLA, 2008).

Figura 6. Produtos de amplificação obtidos por reação em cadeia da polimerase utilizando iniciadores específicos para *K. pneumoniae*



(A, B, C, D) – (CN) Controle negativo, (CP) Controle positivo – isolado de *K. pneumoniae* sensível a antimicrobianos, (1-39) Isolados de *Acanthamoeba* spp. de diferentes ambientes hospitalares, (M) Marcador de tamanho molecular de 100 pb. Seta branca indica o tamanho do produto de amplificação esperado de 260 pb. Fonte: A autora.

No estudo de King et al. (1988) foi avaliada a suscetibilidade ao cloro (cloro residual) de *K. pneumoniae* e outras bactérias, antes e após serem internalizadas por *Acanthamoeba*. Os resultados demonstraram que após sofrerem internalização amebiana, as bactérias apresentaram uma maior resistência ao cloro residual. Antes da exposição às amebas, 99% dos isolados bacterianos não sobreviveram a concentração de 1 mg de cloro residual por litro e após internalização amebiana, estes demonstraram sobreviver a concentrações de 2 a 10 mg de cloro residual por litro.

Correlacionando o estudo de King et al. (1988) com o presente trabalho, deve ser considerada a possibilidade de *K. pneumoniae* resistir a ação de agentes biocidas usualmente empregados na desinfecção de

ambientes hospitalares, visto que esta espécie bacteriana foi encontrada como microrganismo resistente à ameba (MRA) em 12,8% dos isolados acanthamoebianos deste estudo. Trabalhos visando a investigação de agentes biocidas mais eficazes contra esses microrganismos devem ser conduzidos, a fim de determinar qual seria o biocida ideal para uso em ambiente hospitalar.

K. pneumoniae é responsável por mais de 70% das infecções causadas pelo gênero *Klebsiella*, sendo a espécie com maior relevância clínica (PITOUT; NORDMANN; POIRELF, 2015). É considerada um patógeno oportunista, visto que em ambiente hospitalar essa espécie está relacionada com doenças graves como pneumonia, septicemia, infecções em tecidos moles e de trato urinário (HU et al., 2016; CALFEE, 2017). Nos últimos anos, a multirresistência de *K. pneumoniae* a agentes antimicrobianos tornou-se uma preocupação de saúde pública (CRISTINA et al., 2016). Mecanismos de resistência como a produção da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) confere diminuição de sensibilidade ou resistência a praticamente todos os betalactâmicos, restando desta forma poucas opções para tratamento de infecções graves causadas por gram-negativos em hospitais (QUEENAN; BUSH, 2007).

A coexistência de *Acanthamoeba* e *K. pneumoniae* no mesmo ambiente favorece a interação entre esses microrganismos. Assim esta bactéria pode adquirir a capacidade de resistência a digestão amebiana, se tornando um MRA (GREUB; RAOULT, 2004). Deve-se considerar que após a internalização amebiana, a bactéria pode exibir menor suscetibilidade aos antimicrobianos e outras substâncias como apresentado pelos estudos de Miltner e Bermudez (2000) e King et al. (1988).

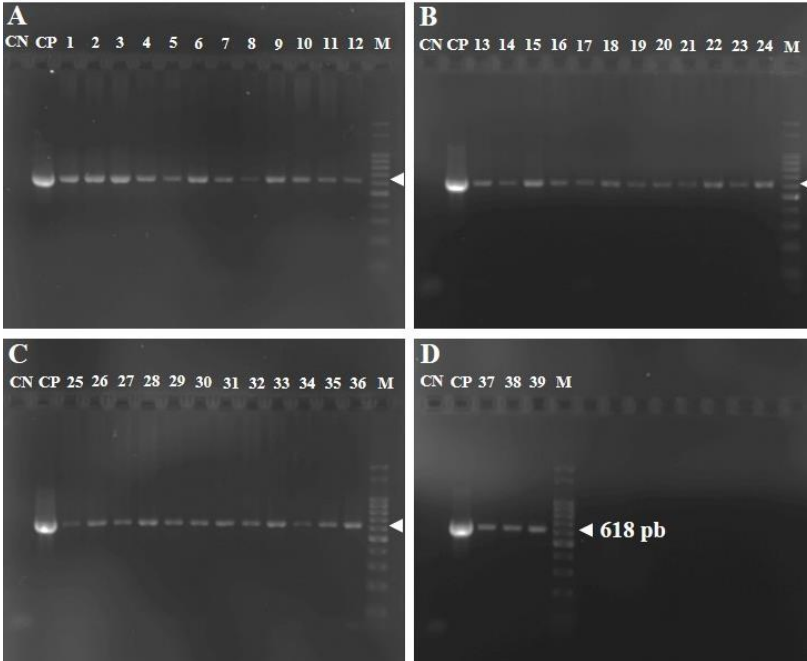
Ressalta-se que neste estudo foi demonstrada pela primeira vez a presença de *K. pneumoniae* como MRA em ambiente hospitalar e além disso em setores considerados críticos como quimioterapia, clínica cirúrgica e centro cirúrgico. Esses resultados indicam que *Acanthamoeba* pode servir de reservatório de potenciais patógenos em ambiente hospitalar.

5.5.3 Investigação da presença de *Pseudomonas* spp. em isolados de *Acanthamoeba* spp.

O gênero *Pseudomonas* foi investigado por PCR convencional utilizando iniciadores gênero-específicos (SPILKER et al., 2004). A partir do DNA total dos 39 isolados de *Acanthamoeba* spp. em estudo,

houve a amplificação do DNA de *Pseudomonas* spp. em todos os isolados acantamebianos analisados (Figura 7).

Figura 7. Produtos de amplificação obtidos por reação em cadeia da polimerase utilizando iniciadores específicos para *Pseudomonas* spp.



(A, B, C, D) – (CN) Controle presença, (CP) Controle positivo – *P. aeruginosa* (ATCC 27853), (1-39) Isolados de *Acanthamoeba* spp. de diferentes ambientes hospitalares, (M) Marcador de tamanho molecular de 100 pb. Seta branca indica o tamanho do produto de amplificação esperado de 618 pb. Fonte: A autora.

A presença de *Pseudomonas* spp. como MRA já foi descrita em alguns estudos. Iovieno et al. (2010) relatou a presença de MRAs em isolados de *Acanthamoeba* obtidos de amostras de pacientes com ceratite amebiana. Dos 37 isolados do estudo, 22 (59,4%) apresentavam MRAs, sendo que destes, 13 pertenciam ao gênero *Pseudomonas*, mostrando-se como o MRA predominante entre os microrganismos investigados. Em um hospital da Alemanha também foi verificada a existência de *Pseudomonas* spp. como MRA em amostras de água potável (MICHEL; BURGHARDT; BERGMANN, 1995).

No Brasil, um estudo realizado no Rio Grande do Sul, utilizando a técnica de PCR convencional, identificou a presença do gênero *Pseudomonas* em 12 isolados de *Acanthamoeba* spp. investigados no estudo, os quais eram provenientes de aparelhos de ar-condicionado e estojos de lentes de contato (MASCHIO; CORÇÃO; ROTT, 2015).

Assim como espécies de *Acanthamoeba*, bactérias do gênero *Pseudomonas* possuem ampla distribuição na natureza e a presença desses microrganismos no mesmo habitat propicia que interações entre eles ocorram. Provavelmente *Acanthamoeba* spp. se alimentam de bactérias e nesse processo *Pseudomonas* spp. se tornam resistentes às amebas, permanecendo no interior amebiano (GREUB; RAOULT, 2004; TASHIRO; USCHIYAMA; NOMURA, 2012).

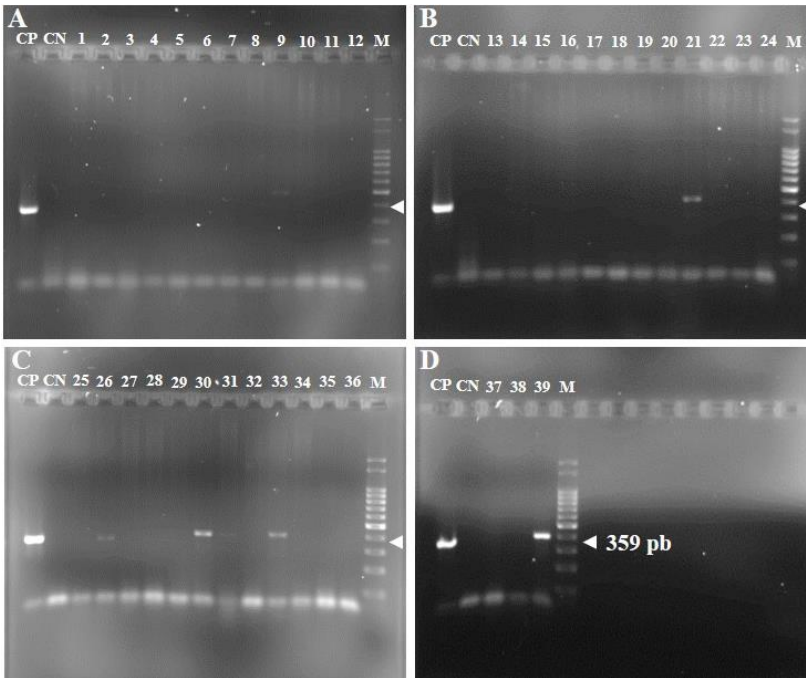
Espécies de *Pseudomonas* estão entre as bactérias gram-negativas frequentemente associadas a infecções hospitalares, causando principalmente infecções respiratórias e de pele em pacientes imunocomprometidos (PELEG; HOOPER, 2010). Isolados resistentes a antimicrobianos são frequentemente relatados para este gênero bacteriano (TASHIRO; USCHIYAMA; NOMURA, 2012).

Acanthamoeba spp. presentes em aparelhos de ar condicionado em ambientes hospitalares podem servir de possíveis fontes de disseminação de infecções relacionadas à assistência à saúde. Tanto as amebas presentes nos aparelhos de ar condicionado quanto as bactérias abrigadas em seu interior podem acometer indivíduos suscetíveis causando infecções graves.

5.5.4 Investigação da presença de *Staphylococcus aureus* em isolados de *Acanthamoeba* spp.

A investigação de *S. aureus* como MRA foi realizada por PCR convencional utilizando iniciadores espécie-específicos (SASAKI et al., 2010). A partir do DNA total dos 39 isolados de *Acanthamoeba* spp. em estudo, houve a amplificação do DNA de *S. aureus* em 7 (18%) dos isolados amebianos. Os isolados de *Acanthamoeba* que apresentaram amplificação são provenientes dos seguintes ambientes do hospital: (9) Quimioterapia (QT - Consultório 02 G/D), (33, 21) Hemodiálise (HEM - Sala de procedimentos central 1 G/D e HEM - Sala de procedimentos central 2 G/D), (26) Emergência (EMG - Sala de reanimação F), (30) Clínica médica I (CMI - Clínica médica I FC), (31) Clínica cirúrgica II (CCII - Sala de curativos G/D) e (39) Unidade de terapia intensiva (UTI - Unidade de terapia intensiva FC) (Figura 8).

Figura 8. Produtos de amplificação obtidos por reação em cadeia da polimerase utilizando iniciadores específicos para *S. aureus*



(A, B, C, D) – (CP) Controle positivo – *S. aureus* (ATCC 25923), (CN) Controle negativo, (1-39) Isolados de *Acanthamoeba* spp. de diferentes ambientes hospitalares, (M) Marcador de tamanho molecular de 100 pb. Seta branca indica o tamanho do produto de amplificação esperado de 359 pb. Fonte: A autora.

S. aureus é um importante patógeno associado a infecções relacionadas à assistência à saúde, principalmente em ambiente hospitalar. Pode causar várias complicações graves como bacteremia, endocardite, osteomielite e síndrome do choque tóxico (RASMUSSEN et al., 2011; REDDY; SRIRAMA; DIRISALA, 2017). Possui vários fatores de virulência importantes no processo de desenvolvimento de doenças. Além disso, muitas cepas de *S. aureus* têm se mostrado resistentes a antimicrobianos, como é o caso de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), que tem sido relacionado com pior desfecho clínico quando comparado a isolados sensíveis à meticilina (POWERS; WARDENBURG, 2014; HASSOUN; LINDEN; FRIEDMAN, 2017).

Interações entre *Acanthamoeba* spp. e *S. aureus* já foram descritas na literatura. *S. aureus* é capaz de sobreviver e se multiplicar no interior

amebiano (MARCIANO-CABRAL, 2004). A caracterização de *S. aureus* como MRA já foi relatada em estudos de cocultivo, incluindo MRSA (HUWS et al. 2006; DE SOUZA et al., 2017). Entretanto, a presença de *S. aureus* em isolados ambientais e clínicos de *Acanthamoeba* não foi encontrada na literatura.

Em ensaios de cocultivo de *A. polyphaga* e *S. aureus* resistente à meticilina, foi verificado que MRSA foi capaz de permanecer viável no interior amebiano durante 216 horas (9 dias), em condições experimentais. Além disso, o lisado da cultura amebiana foi capaz de aumentar o crescimento de *S. aureus* resistente à meticilina, assim como *A. polyphaga* obteve maior crescimento na presença dessa bactéria, mostrando que a interação entre esses dois microrganismos tem influência importante na sobrevivência de ambos (DE SOUZA et al., 2017).

Devido a similaridade de *Acanthamoeba* a macrófagos, particularmente em relação a estrutura celular foram avaliadas interações dessas células com *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA) e MRSA no estudo de Cardas, Ahmed e Alsam (2012). Os achados revelaram que MSSA e MRSA exibiram semelhanças na adesão e invasão das células de *A. castellanii* e macrófagos humanos; sugerindo que *Acanthamoeba* apresenta características semelhantes aos macrófagos no processo de interação com MSSA e MRSA. Além disso, verificou-se a sobrevivência dessas bactérias no interior de cistos maduros de *Acanthamoeba*. Considerando que os cistos são as formas resistentes desse protozoário e que podem ser encontrados no ar, esses dados sugerem que *Acanthamoeba* spp. pode atuar como “Cavalo de Troia” auxiliando no processo de propagação de MRSA a hospedeiros suscetíveis (CARDAS; AHMED; ALSAM, 2012).

As amebas podem servir como um “campo de treinamento” para os MRAs, pois como já mencionado, após internalização amebiana os MRAs adquirem maior facilidade de adaptação a células eucarióticas fagocíticas, o que pode facilitar no desenvolvimento de um processo infeccioso (TOSETTI; CROXATTO; GREUB, 2014). Como sugerido por Huws et al. (2008), *Acanthamoeba* spp. podem aumentar a sobrevivência de muitas bactérias patogênicas no ambiente, o que representa um alto risco para a saúde pública, pois estas bactérias não são afetadas pelo tratamento convencional de biocidas (BALCZUN; SCHEID, 2017). Este é o primeiro relato da presença de *S. aureus* em isolados de *Acanthamoeba* em ambientes hospitalares, sendo estes provenientes de setores como hemodiálise, quimioterapia e UTI. Esses resultados devem servir de alerta, visto que este protozoário pode estar

propiciando proteção dessas bactérias a intervenções externas e também dispersando-as em ambientes hospitalares.

5.5.5 Investigação da presença de *Legionella* spp. em isolados de *Acanthamoeba* spp.

Ao investigar a presença de *Legionella* spp. por semi-nested PCR utilizando iniciadores gênero-específicos (MAGNET et al., 2015), não foi detectada amplificação de DNA desta bactéria em nenhum dos isolados investigados na primeira reação da semi-nested PCR. Entretanto, na segunda reação, 26 (66,7%) dos 39 isolados amebianos apresentaram *Legionella* spp. como MRA (Tabela 3).

Legionella spp. são bactérias intracelulares facultativas, fastidiosas, amplamente distribuídas em ambientes aquáticos como córregos, lagos e rios. Nestes habitats, frequentemente utilizam amebas de vida livre como hospedeiros para sobrevivência intracelular e multiplicação (MISCH, 2016; SPRINGSTON; YOCAVITCH, 2017). O gênero *Legionella* compreende mais de 60 espécies, e destas aproximadamente 30 são capazes de causar infecções em humanos (LANTERNIER et al., 2017). *Legionella* está associada principalmente a duas doenças: Doença do Legionário, uma forma grave e potencialmente fatal de pneumonia e a Febre de Pontiac, a qual é uma manifestação mais branda, autolimitada, que não evolui para pneumonia (SPRINGSTON; YOCAVITCH, 2017).

Tabela 3. Resultado das reações em cadeia em polimerase para detecção de *Legionella* spp. (continua)

ISOLADOS	Semi-nested PCR	
	1ª reação	2ª reação
CAC - Consultório 01 F	-	-
CAC - Consultório 04 F	-	-
CC - Sala 01 G/D	-	+
CC - Sala 02 G/D	-	+
CC - Sala 04 G/D	-	+
CO - Centro obstétrico FC	-	-
CCI - Leito 406 G/D	-	-
CCI - Leito 410 G/D	-	-
CCI - Sala de procedimentos G/D	-	+
CCII - Sala de curativos G/D	-	+
CMI - 309F	-	+
CMI - 310A	-	+
CMI - 310F	-	+
CMI - 311A	-	+
CMI - 311F	-	-
CMI - Clínica médica I FC	-	+
CMII - 314 A	-	+
CMII - 324 A	-	-
EMG - Ala direita F	-	-
EMG - Ala esquerda F	-	-
EMG - Sala de reanimação F	-	+
EST - Arsenal F	-	-
EST - Sala de preparo F	-	+
GIN - Quarto 202 A	-	+
GIN - Quarto 202 F	-	+
GIN - Consultório 02A	-	-
GIN - Consultório 02F	-	+
HEM - Sala de procedimentos 1 G/D	-	+
HEM - Sala de procedimentos 2 G/D	-	+
HEM - Sala de repouso F	-	+
OFT - Sala de espera F	-	+
OFT - Consultório 02 F	-	+
PED - Sala de cuidados especiais A	-	+
PED - Sala de cuidados especiais F	-	+
QT - Consultório 01G/D	-	+
QT - Consultório 02 G/D	-	-

Tabela 3. Resultado das reações em cadeia em polimerase para detecção de *Legionella* spp. (conclusão)

ISOLADOS	Semi-nested PCR	
	1ª reação	2ª reação
QT - Sala de procedimentos G/D	-	-
QT - Quimioterapia FC	-	+
UTI - Unidade de terapia intensiva FC	-	+

(CAC) Centro Ambulatorial Cirúrgico, (CC) Centro Cirúrgico, (CO) Centro Obstétrico, (CCI) Clínica Cirúrgica I, (CCII) Clínica Cirúrgica II, (CMI) Clínica Médica I, (CMII) Clínica Médica II, (EMG) Emergência, (EST) Esterilização, (GIN) Ginecologia, (HEM) Hemodiálise, (OFT) Oftalmologia, (PED) Pediatria, (QT) Quimioterapia, (UTI) Unidade de Terapia Intensiva, (A) Aleta, (F) Filtro, (FC) Filtro Central e (G/D) Grelha/Difusor, (-) Não detectado, (+) Detectado.

Fonte: A autora.

Dentre os MRAs, o gênero *Legionella* é um dos mais relatados e investigados devido a morbimortalidade significativa associada a esta bactéria. Nos Estados Unidos e Austrália, taxas de mortalidade de 14% foram atribuídas a infecções hospitalares causadas por *Legionella* spp. e entre 5 a 10% das infecções são adquiridas na comunidade (PALUSIŃSKA-SZYSZ; CENDROWSKA-PINKOSZ, 2009). No Brasil, são poucos os relatos de infecções causadas por *Legionella* spp., ocorrendo provavelmente subnotificação dos casos. Alguns casos de infecções já foram descritos em São Paulo (GOMES et al., 1989; LEVIN et al., 1993) e no Rio Grande do Sul (CHEDID et al., 2005). A alta mortalidade está relacionada ao diagnóstico tardio e terapia inadequada. Algumas espécies de *Legionella* são consideradas patógenos oportunistas, pois podem causar infecções em indivíduos imunocomprometidos (CUNHA; BURILLO; BOUZA, 2016). Fatores de risco incluem, ser homem com mais de 50 anos de idade, diabetes, tabagismo, insuficiência renal que requer diálise, transplante de órgãos, tratamento com corticosteroides, SIDA e outras doenças subjacentes como câncer (BORELLA et al., 2016; SPRINGSTON; YOCAVITH, 2017).

Descrições de surtos de infecções por *Legionella* em ambientes hospitalares foram associados à inalação bacteriana a partir de água potável, fontes decorativas e torres de resfriamento contaminadas por *Legionella* spp. (HAUPT et al., 2012; DECKER; PALMORE, 2013). Espécies de *Acanthamoeba* já foram descritas albergando *Legionella* spp. em seu interior em amostras de água (torneiras, chuveiros e ventiladores umidificadores) de um hospital Iraniano. As amostras eram

representativas de ambientes como: unidade de terapia intensiva, centro cirúrgico, enfermaria, dentre outras (DOUST et al., 2008).

O padrão ouro para o diagnóstico de doenças causadas por *Legionella* é a cultura, apresentando boa especificidade, porém sensibilidade relativamente baixa (DIEDEREN, 2008). Por esse motivo, outros métodos, como PCR, têm sido empregados para diagnóstico e monitoramento dessa bactéria em amostras ambientais (CARRATALÀ; GARCIA-VIDAL, 2010; WHILEY; TAYLOR, 2016).

A técnica de semi-nested PCR tem sido utilizada para detectar *Legionella* spp. em amostras de água de forma simultânea à cultura, visando aumentar a sensibilidade de detecção de *Legionella* em amostras de água e reduzir interferência de inibidores de PCR, os quais são muito frequentes nesse tipo de amostra (MIYAMOTO et al., 1997; HUANG et al., 2011). Acredita-se que devido a essa técnica ser composta por duas reações de PCR, boa parte dos inibidores, se presentes, são reduzidos pela diluição da amostra ao realizar a segunda reação, consequentemente contribuindo para aumento da sensibilidade do método (MIYAMOTO et al., 1997).

No estudo realizado por Miyamoto et al. (1997), as taxas de detecção de *Legionella* spp. em amostras de água provenientes de torres de resfriamento foram 91,8% (45 de 49) pelo ensaio de semi-nested PCR e 79,5% (39 de 49) pelo método de cultura. Huang et al. (2011) avaliaram a presença de *Legionella* spp. em amostras de água em Taiwan. Utilizando o mesmo ensaio de semi-nested PCR, verificaram que a técnica permitiu detectar *Legionella* spp. em 23,5% (16 de 68) e o método de cultura 11,8% (8 de 68) das amostras. Os autores destacam a importância do uso de uma metodologia mais sensível simultânea a realização da cultura bacteriana.

Em uma investigação realizada por Magnet et al. (2015), a presença de *Legionella* spp. em isolados ambientais de *Acanthamoeba* foi relatada em 43 (76,8%) dos 56 isolados acantamebianos obtidos no estudo. A semi-nested PCR era composta primeiramente por uma reação de PCR convencional e a segunda uma reação por PCR em tempo real, assim como no presente estudo. Os isolados amebianos eram provenientes de estações de tratamento de água e de piscinas naturais da Espanha. Em nosso estudo, obteve-se uma positividade semelhante de 66,7% para a presença de *Legionella* spp. como MRA nos isolados amebianos avaliados.

Estudos realizados no Brasil, que investigaram *Legionella* spp. como MRA não detectaram esta bactéria em isolados amebianos (MASCHIO, 2013; SOARES, 2016). Ressaltamos que nesses trabalhos

foi utilizada PCR convencional para detecção, a qual é menos sensível que o uso de semi-nested PCR, principalmente se contém em sua segunda reação uma PCR em tempo real (WÓJCIK-FATLA; STOJEK; DUTKIEWICZ, 2012).

Os resultados obtidos neste estudo permitiram evidenciar a importância do uso de um método mais sensível para detecção de *Legionella* como MRA. Nos resultados (Tabela 3) da primeira reação da semi-nested PCR, que é constituída de uma PCR convencional, não foi detectada amplificação de *Legionella* nos isolados amebianos. Entretanto, ao realizar a segunda etapa da reação, a qual é composta de uma PCR em tempo real, obteve-se amplificação de *Legionella* em 26 (66,7%) dos 39 isolados de *Acanthamoeba*.

No meio ambiente, as espécies de *Legionella* podem estar associadas a biofilmes, assim como *Acanthamoeba* spp. frequentemente estão associadas a essas comunidades microbianas, favorecendo desta forma o contanto desses microrganismos (CARRATALÀ; GARCIA-VIDAL, 2010). Todas as espécies de *Legionella* estudadas até o momento têm a capacidade de infectar e se replicar no interior de AVL (SHEEHAN; HENSON; FERRIS, 2005; DECLERCK et al., 2007; DECLERCK, 2010). A associação de *Legionella* spp. com amebas pode acarretar em fenótipos bacterianos mais virulentos, auxiliar na dispersão e proporcionar proteção contra condições ambientais adversas ou ação de biocidas, como calor excessivo e cloro (MERCANTE; WINCHELL, 2015). Estudos indicam que *Legionella* hospedada por amebas apresentam de 30 a 120 vezes mais proteção a agentes usualmente empregados no tratamento de água (SPRINGSTON; YOCAVITCH, 2017).

Considerando que a presença de *Legionella* spp. em ambientes hospitalares está associada a surtos de doenças causadas por essa bactéria (AGARWAL; ABELL; FILE, 2016) e que amebas infectadas poderiam ser as partículas infecciosas que carregam *Legionella* spp. aos pulmões (GREUB; RAOULT, 2004), os resultados aqui apresentados merecem uma atenção especial, pois a associação desses microrganismos pode ser considerada uma ameaça potencial à saúde, para as pessoas que circulam pelos ambientes do hospital, mas principalmente para os pacientes hospitalizados, os quais estão mais propensos ao desenvolvimento de infecções. A presença de *Legionella* spp. em isolados de *Acanthamoeba* spp. de ambientes como centro cirúrgico, hemodiálise, quimioterapia e Unidade de Terapia Intensiva, indica a necessidade da adesão de medidas preventivas para o controle amebiano e bacteriano nesses locais.

Um dos aspectos relevantes no estudo de MRAs se deve ao potencial da interação ameba-bactéria de influenciar na patogenicidade, virulência ou até mesmo na suscetibilidade de *Acanthamoeba* spp. aos antimicrobianos (IOVIENO et al., 2010). Os resultados da investigação de MRAs do isolado CCII - Sala de curativos G/D corroboram com esta afirmação. Esse isolado foi classificado como patogênico e considerado como possivelmente o mais virulento deste estudo, sendo que o mesmo apresentou todos os MRAs investigados por métodos moleculares. Além deste isolado, o CC - Sala 04 G/D considerado patogênico também apresentou todos os MRAs, com exceção de *S. aureus*.

6. CONCLUSÕES

Os isolados de ambientes hospitalares incluídos neste estudo foram confirmados como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*, sendo identificados os genótipos T4, T5 e T11. A prevalência do genótipo T4 foi verificada, assim como em outros estudos. Este genótipo encontra-se mais disperso no ambiente e associado a maioria dos casos de infecções em humanos.

Os ensaios de patogenicidade por parâmetros fisiológicos demonstraram majoritariamente a presença de isolados com patogenicidade intermediária, seguido de isolados patogênicos, entretanto ensaios *in vivo* fazem-se necessários para confirmar essa caracterização.

Espécies de *Acanthamoeba* podem servir como possíveis fontes de disseminação de infecções relacionadas à assistência à saúde, pois exercem a função de reservatórios de microrganismos patogênicos como *K. pneumoniae*, *Legionella* spp., *Pseudomonas* spp., e *S. aureus* em ambientes hospitalares. Cabe ressaltar que as próprias amebas também têm capacidade de causar infecções e os genótipos identificados nesse estudo já foram relatados como causadores de infecções em humanos. Além disso, alguns isolados apresentaram perfil patogênico quando avaliados, destacando-se o isolado CCII - Sala de curativos G/D, classificado como patogênico, considerado como possivelmente o mais virulento deste estudo e que apresentou todos os MRAs investigados. Dessa forma, indivíduos hospitalizados expostos as amebas, os quais frequentemente apresentam-se imunologicamente suscetíveis a infecções, poderiam ser acometidos por infecções causadas por esses microrganismos.

Este foi o primeiro relato de *K. pneumoniae* e *S. aureus* como MRAs em isolados ambientais de *Acanthamoeba*. Além disso este foi o primeiro estudo realizado no Brasil que detectou *Legionella* spp. como MRA em isolados de *Acanthamoeba*.

Acanthamoeba spp. presentes em aparelhos de ar condicionado podem ser utilizadas como marcador da qualidade microbiológica do ar em ambiente hospitalar, visto que neste estudo todos os isolados amebianos apresentaram MRAs em seu interior. Além disso, observa-se a necessidade de procedimentos de desinfecção mais eficientes para controlar a presença de amebas e outros microrganismos nos sistemas de ar condicionado no hospital analisado.

Mais estudos avaliando a presença dessas amebas e MRAs devem ser conduzidos em ambientes hospitalares, a fim de obter dados

epidemiológicos e ter o conhecimento do real papel desses protozoários em ambientes hospitalares.

REFERÊNCIAS

- ABD, H. et al. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 600–606, 2003.
- ABDUL MAJID, M. A. et al. Pathogenic waterborne free-living amoebae: An update from selected Southeast Asian countries. **Plos One**, v. 12, n. 2, p. 1–17, 2017.
- ADL, S. M. et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 399–451, 2005.
- ADL, S. M. et al. The revised classification of eukaryotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 429–493, 2012.
- AGARWAL, S.; ABELL, V.; FILE, T. M. Nosocomial (Health Care–Associated) Legionnaire’s Disease. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 31, n. 1, p. 155–165, 2016.
- AICHELBURG, A. C. et al. Successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* sp. infection with miltefosine. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 11, p. 1743–1746, 2008.
- AL-HERRAWY, A. et al. Morpho-Physiological and biochemical criteria of *Acanthamoeba* spp. isolated from the Egyptian aquatic environment. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 8, n. 2, p. 302–312, 2013.
- ALKHARASHI, M. et al. Medical interventions for *Acanthamoeba* keratitis. **The Cochrane database of systematic reviews**, v. 2, n. 2, 2015.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7256**: Tratamento de ar em estabelecimentos assistenciais de saúde (EAS) - Requisitos para projeto e execução das instalações. Rio de Janeiro: ABNT, 2005.

- ASTORGA, B. et al. *Acanthamoeba* belonging to T3, T4, and T11: Genotypes isolated from air-conditioning units in Santiago, Chile. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 542–544, 2011.
- BALCZUN, C.; SCHEID, P. Free-Living amoebae as hosts for and vectors of intracellular microorganisms with public health significance. **Viruses**, v. 9, n. 65, p. 1–18, 2017.
- BARKER, J.; HUMPHREY, T. J.; BROWN, M. W. R. Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. **FEMS Microbiology Letters**, v. 173, n. 1, p. 291–295, 1999.
- BEHERA, H. S.; SATPATHY, G.; TRIPATHI, M. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* spp. from *Acanthamoeba* meningitis/meningoencephalitis (AME) patients in India. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 442, p. 1–6, 2016.
- BERTELLI, C.; GREUB, G. Lateral gene exchanges shape the genomes of amoeba-resisting microorganisms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 1–15, 2012.
- BOOTON, G. C. et al. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1689–1693, 2005.
- BORELLA, P. et al. Hospital-acquired *Legionella* infections: an update on the procedures for controlling environmental contamination. **Annali Di Igiene**, v. 28, n. 1, p. 98–108, 2016.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução **RE N° 9**, de 16 de janeiro de 2003. Determina a publicação de orientação técnica elaborada por grupo técnico assessor, sobre padrões referenciais de qualidade do ar interior, em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo. 2003.
- BRASIL. Lei n. 13.589, de janeiro de 2018. Dispõe sobre a manutenção de instalações e equipamentos de sistemas de climatização de ambientes. Brasília: DF. 2018.

- BRELAND, M.; BECKMANN, N. Amebic osteomyelitis in an immunocompromised patient. **Radiology Case Reports**, v. 11, n. 3, p. 207–211, 2016.
- CALFEE, D. P. Recent advances in the understanding and management of *Klebsiella pneumoniae*. **F1000 Research**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2017.
- CARDAS, M.; AHMED, N.; ALSAM, S. *Staphylococcus aureus* exhibit similarities in their interactions with *Acanthamoeba* and ThP1 macrophage-like cells. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 4, p. 513–518, 2012.
- CARLESSO, A. M. et al. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. **Current Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 185–190, 2010.
- CARNT, N.; STAPLETON, F. Strategies for the prevention of contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis: A review. **Ophthalmic and Physiological Optics**, v. 36, n. 2, p. 77–92, 2016.
- CARRATALÀ, J.; GARCIA-VIDAL, C. An update on *Legionella*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 152–157, 2010.
- CARVALHO, F. R. S. et al. Twenty years of *Acanthamoeba* keratitis. **Cornea**, v. 28, n. 5, p. 516–519, 2009.
- CASTRILLÓN, J.; OROZCO, L. *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. **Revista Chilena Infectología**, v. 30, n. 2, p. 147–155, 2013.
- CATEAU, E. et al. Relationships between free living amoebae and *Exophiala dermatitidis*: a preliminary study. **Medical Mycology**, v. 47, n. 1, p. 115–118, 2009.
- CATEAU, E. et al. *Acanthamoeba* sp. promotes the survival and growth of *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 319, n. 1, p. 19–25, 2011.
- CATEAU, E. et al. Free-living amoebae: What part do they play in healthcare-associated infections? **Journal of Hospital Infection**, v. 87, n. 3, p. 1–10, 2014.

CAUMO, K. et al. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 103, n. 6, p. 477–485, 2009.

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

CHAN, L. L. et al. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* spp. from air-conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. **Acta Tropica**, v. 117, n. 1, p. 23–30, 2011.

CHEDID, F BERNADETE, M. et al. Community-acquired pneumonia by *Legionella pneumophila* serogroups 1 – 6 in Brazil. **Respiratory Medicine**, v. 99, n. 1, p. 966–975, 2005.

CHOMICZ, L. et al. Emerging threats for human health in poland: pathogenic isolates from drug resistant *Acanthamoeba* keratitis monitored in terms of their in vitro dynamics and temperature adaptability. **BioMed Research International**, n. 1, p. 1–8, 2015.

CIRILLO, J. D.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L. S. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. **Infection and immunity**, v. 62, n. 8, p. 3254–3261, 1994.

CIRILLO, J. D. et al. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 9, p. 3759–3767, 1997.

CIRILLO, J. D. et al. Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 9, p. 4427–4434, 1999.

CORSARO, D. et al. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). **Parasitology Research**, v. 114, n. 7, p. 2481–2490, 2015.

- CORSARO, D. et al. Update on *Acanthamoeba jacobsi* genotype T15, including full-length 18S rDNA molecular phylogeny. **Parasitology Research**, v. 116, n. 1, p. 1273–1284, 2017.
- CRISTINA, M. L. et al. Epidemiology and biomolecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in an Italian hospital. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 3, p. 149–156, 2016.
- CUNHA, B. A.; BURILLO, A.; BOUZA, E. Legionnaires' disease. **The Lancet**, v. 387, n. 10016, p. 376–385, 2016.
- DA ROCHA-AZEVEDO, B.; SILVA-FILHO, F.C. Biological characterization of a clinical and an environmental isolate of *Acanthamoeba polyphaga*: Analysis of relevant parameters to decode pathogenicity. **Archives of Microbiology**, v. 188, n. 5, p. 441–449, 2007.
- DA ROCHA-AZEVEDO, B.; TANOWITZ, H. B.; MARCIANO-CABRAL, F. Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 1–14, 2009.
- DA SILVA, D. et al. Infecções hospitalares associadas à qualidade do ar em ambientes climatizados. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 3, n. 4, p. 153–157, 2013.
- DE SOUZA, T. K. et al. Interaction between methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Acanthamoeba polyphaga*. **Current Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 541–549, 2017.
- DECKER, B. K.; PALMORE, T. N. The role of water in healthcare-associated infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. 139–148, 2013.
- DECLERCK, P. et al. Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. **Water Research**, v. 41, n. 14, p. 3159–3167, 2007.

DECLERCK, P. Biofilms: The environmental playground of *Legionella pneumophila*. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 557–566, 2010.

DIEDEREN, B. M. W. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. **Journal of Infection**, v. 56, n. 1, p. 1–12, 2008.

DOUST, R. H. et al. Interaction of Legionellae and free-living amoebae within hospital water supplies. **Research Journal of Parasitology**, v.3, n. 13, p. 104–113, 2008.

DRANCOURT, M.; ADÉKAMBI, T.; RAOULT, D. Interactions between *Mycobacterium xenopi*, amoeba and human cells. **Journal of Hospital Infection**, v. 65, n. 2, p. 138–142, 2007.

EL-SHARKAWY, M.; NOWEIR, M. H. Indoor air quality levels in a University Hospital in the Eastern Province of Saudi Arabia. **Journal of Family and Community Medicine**, v. 21, n. 1, p. 39–47, 2014.

ETCHEBEHERE, A. et al. A metrologia participa do controle de infecções hospitalares cuidando da qualidade do Ar. **METROSAÚDE – Simpósio de Metrologia na Área da Saúde**, v. 1, n. 1, p. 1–6, 2005.

FIESELER, L. et al. *Acanthamoeba* release compounds which promote growth of *Listeria monocytogenes* and other bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 7, p. 3091–3097, 2014.

FOWLER, M.; CARTER, R. F. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. **British Medical Journal**, v. 2, n. 1, p. 740–742, 1965.

FRITSCHÉ, T. R.; SOBEK, D.; GAUTOM, R. K. Enhancement of in vitro cytopathogenicity by *Acanthamoeba* spp. following acquisition of bacterial endosymbionts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 166, n. 2, p. 231–236, 1998.

FUERST, P. A.; BOOTON, G. C.; CRARY, M. Phylogenetic analysis and the evolution of the 18S rRNA gene typing system of *Acanthamoeba*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 69–84, 2015.

- GALARZA, C. et al. Cutaneous acanthamebiasis infection in immunocompetent and immunocompromised patients. **International Journal of Dermatology**, v. 48, n. 12, p. 1324–1329, 2009.
- GEISEN, S. et al. *Acanthamoeba* everywhere: High diversity of *Acanthamoeba* in soils. **Parasitology Research**, v. 113, n. 9, p. 3151–3158, 2014.
- GELMAN, B. B. et al. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. **Journal of the American Medical Association**, v. 285, n. 19, p. 2445–2446, 2001.
- GOMES, J. C. P. et al. *Legionella pneumophila* associada a insuficiência respiratória aguda. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 31, n. 6, p. 368–376, 1989.
- GOMES, T. D. S. et al. *Acanthamoeba* spp. in contact lenses from healthy individuals from Madrid, Spain. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–12, 2016.
- GREUB, G.; RAOULT, D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 413–433, 2004.
- GRIFFIN, J. Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. **Science**, v. 178, n. 18, p. 869–870, 1972.
- GRAUDENZ, G.S; DANTAS, E. Poluição dos ambientes interiores: doenças e sintomas relacionados às edificações. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 2, n. 2, p. 23-21, 2007.
- GUIMARAES, A. J. et al. *Acanthamoeba* spp. as a universal host for pathogenic microorganisms: One bridge from environment to host virulence. **Microbiological Research**, v. 193, n. 1, p. 30–38, 2016.
- GULLETT, J. et al. Disseminated granulomatous *Acanthamoeba* infection presenting as an unusual skin lesion. **The American Journal of Medicine**, v. 67, n. 5, p. 891–896, 1979.

HAIJALILLO, E. et al. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains (T4, T9, and T11) from amoebic keratitis patients in Iran. **Parasitology Research**, v. 115, n. 8, p. 3147–3151, 2016.

HASSAN, A. et al. *Acanthamoeba* contamination of hemodialysis and dental units in Alexandria, Egypt: A neglected potential source of infection. **Journal of Infection and Public Health**, v. 5, n. 4, p. 304–310, 2012.

HASSOUN, A.; LINDEN, P. K.; FRIEDMAN, B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations – a review of recent developments in MRSA management and treatment. **Critical Care**, v. 21, n. 211, p. 1–10, 2017.

HAUPT, T. E. et al. An outbreak of legionnaires disease associated with a decorative water wall fountain in a hospital. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 33, n. 2, p. 185–191, 2012.

HU, L. et al. Outbreak by ventilator-associated ST11 *K. pneumoniae* with co-production of CTX-M-24 and KPC-2 in a SICU of a tertiary teaching hospital in central China. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 1–6, 2016.

HUANG, S. W. et al. Utilization of polymerase chain reaction and selective media cultivation to identify *Legionella* in Taiwan spring water samples. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 174, n. 1, p. 427–437, 2011.

HUWS, S. A. et al. Amoebae promote persistence of epidemic strains of MRSA. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 1130–1133, 2006.

HUWS, S. A. et al. Interactions of some common pathogenic bacteria with *Acanthamoeba polyphaga*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 282, n. 2, p. 258–265, 2008.

IBRAHIM, Y. W.; BOASE, D. L.; CREE, I. A. How could contact lens wearers be at risk of *Acanthamoeba* infection? A review. **Journal of Optometry**, v. 2, n. 2, p. 60–66, 2009.

IOVIENO, A. et al. Detection of bacterial endosymbionts in clinical *Acanthamoeba* isolates. **Ophthalmology**, v. 117, n. 3, p. 445–452, 2010.

JAGER, B. V.; STAMM, W. P. Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. **The Lancet**, v. 300, n. 1, p. 1343–1345, 1972.

KEBBI-BEGHDADI, C.; GREUB, G. Importance of amoebae as a tool to isolate amoeba-resisting microorganisms and for their ecology and evolution: The *Chlamydia* paradigm. **Environmental Microbiology Reports**, v. 6, n. 4, p. 309–324, 2014.

KHAN, N. A.; JARROLL, E. L.; PAGET, T. A. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. **Current Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 204–208, 2001.

KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: Biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 4, p. 564–595, 2006.

KHAN, N. A.; SIDDIQUI, R. War on terror cells: killing the host that harbours “superbugs” is an infection control strategy in our fight against infectious diseases. **Pathogens and Global Health**, v. 108, n. 1, p. 4–10, 2014.

KILIC, A. et al. Isolation of *Acanthamoeba* isolates belonging to T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental samples in Ankara, Turkey isolation of *Acanthamoeba* isolates belonging to T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental samples in Ankara, Turkey. **Acta Parasitologica**, v. 49, n. 3, p. 246–252, 2004.

KING, C. H. et al. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 3023–3033, 1988.

KOCAZEYBEK, B. Free living amoebae: *Acanthamoeba* species pose a great risk for human health. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 349–350, 2015.

- LA SCOLA, B.; RAOULT, D. *Afipia felis* in hospital water supply in association with free-living amoebae. **Lancet**, v. 353, n. 1, p. 1330, 1999.
- LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 7, n. 2, p. 75–79, 2001.
- LAMOTHE, J.; THYSSEN, S.; VALVANO, M. A. *Burkholderia cepacia* complex isolates survive intracellularly without replication within acidic vacuoles of *Acanthamoeba polyphaga*. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1127–1138, 2004.
- LANTERNIER, F. et al. Legionnaire's disease in compromised hosts. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 31, n. 1, p. 123–135, 2017.
- LASS, A. et al. Detection of *Acanthamoeba* spp. in water samples collected from natural water reservoirs, sewages, and pharmaceutical factory drains using LAMP and PCR in China. **Science of the Total Environment**, v. 584–585, n. 1, p. 489–494, 2017.
- LEDEE, D. R. et al. Molecular identification of T4 and T5 genotypes in isolates from *Acanthamoeba* keratitis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 1458–1462, 2009.
- LEUNG, M.; CHAN, A. H. S. Control and management of hospital indoor air quality. **Medical science monitor**, v. 12, n. 3, p. 17–23, 2006.
- LEVIN, A. S. et al. Five cases of nosocomial and community-acquired legionnaires disease in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 1, p. 103–106, 1993.
- LEVINE, N. D. et al. A newly revised classification of the protozoa. **The Journal of Protozoology**, v. 27, n. 1, p. 37–58, 1980.
- LIU, H. et al. Genetic diversity of *Acanthamoeba* isolates from ocean sediments. **Korean Journal of Parasitology**, v. 44, n. 2, p. 117–125, 2006.

LIU, Y. et al. PCR detection of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula based on 16S-23S internal transcribed spacer. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 3, p. 230–235, 2008.

LORENZO-MORALES, J. et al. *Acanthamoeba* keratitis: An emerging disease gathering importance worldwide? **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 4, p. 181–187, 2013.

LORENZO-MORALES, J.; KHAN, N. A.; WALOCHNIK, J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite**, v. 22, n. 10, p. 1–10, 2015.

LUND, O. E.; STEFANI, F. H.; DECHANT, W. Amoebic keratitis: a clinicopathological case report. **British Journal of Ophthalmology**, v. 62, n. 6, p. 373–375, 1978.

MACEDO, Jefferson Peres de. Caracterização de *Acanthamoeba* spp. isoladas de amostras de ar condicionado do Hospital Universitário de Florianópolis-SC. 2016. 65p. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia (Obtenção do título de farmacêutico). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

MAGHSOOD, A. H. et al. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 755–759, 2005.

MAGNET, A. et al. Vectorial role of *Acanthamoeba* in *Legionella* propagation in water for human use. **Science of the Total Environment**, v. 505, n. 1, p. 889–895, 2015.

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

MARCIANO-CABRAL, F. Introductory remarks: Bacterial endosymbionts or pathogens of free-living amoebae. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 497–501, 2004.

MARCIANO-CABRAL, F.; JAMERSON, M.; KANESHIRO, E. S. Free-living amoebae, *Legionella* and *Mycobacterium* in tap water

supplied by a municipal drinking water utility in the USA. **Journal of Water and Health**, v. 8, n. 1, p. 71–82, 2010.

MASCHIO, V. J. Identificação de endossimbiontes em isolados de *Acanthamoeba* spp. 2013. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas de Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

MASCHIO, V. J. et al. *Acanthamoeba* T4, T5 and T11 isolated from mineral water bottles in southern Brazil. **Current Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 6–9, 2014.

MASCHIO, V. J.; CORÇÃO, G.; ROTT, M. B. Identification of *Pseudomonas* spp. as amoeba-resistant microorganisms in isolates of *Acanthamoeba*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 1, p. 81–83, 2015.

MATHERS, W. D. et al. Confirmation of confocal microscopy diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using polymerase chain reaction analysis. **Archives of Ophthalmology**, v. 118, n. 1, p. 178–183, 2000.

MAYCOCK, N. J. R.; JAYASWAL, R. Update on *Acanthamoeba* keratitis: Diagnosis, treatment, and outcomes. **Cornea**, v. 0, n. 0, p. 713–720, 2016.

MERCANTE, J. W.; WINCHELL, J. M. Current and emerging *Legionella* diagnostics for laboratory and outbreak investigations. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 95–133, 2015.

MICHEL, R.; BURGHARDT, H.; BERGMANN, H. *Acanthamoebae* isolated from highly contaminated drinking water system of a hospital exhibited natural infections with *Pseudomonas aeruginosa*. **Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin**, v. 196, n. 1, p. 532–544, 1995.

MILTNER, E. C.; BERMUDEZ, L. E. *Mycobacterium avium* grown in *Acanthamoeba castellanii* is protected from the effects of antimicrobials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1990–1994, 2000.

MISCH, E. A. *Legionella*: Virulence factors and host response. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 3, p. 280–286, 2016.

MIYAMOTO, H. et al. Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of legionellae in hospital cooling tower water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2489–2494, 1997.

MOBIN, M.; SALMITO, M. D. A. Microbiota fúngica dos condicionadores de ar nas unidades de terapia intensiva de Teresina, PI. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 6, p. 556–559, 2006.

MOTA, R. J. B. S. et al. Qualidade do ar interno no ambiente hospitalar: Uma revisão integrativa. **Revista Saúde**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2014.

NEFF, R. J. Purification, axenic cultivation, and description of a soil Amoeba, *Acanthamoeba* sp. **The Journal of Protozoology**, v. 4, n. 3, p. 176–182, 1957.

NEFF, R. J. The biochemistry of amoebic encystment. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 23, p. 51-81, 1969.

NIYYATI, M. et al. Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains from dust sources in Iran. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 4, p. 425–427, 2009.

NIYYATI, M. et al. Screening of recreational areas of rivers for potentially pathogenic free-living amoebae in the suburbs of Tehran, Iran. **Journal of Water and Health**, v. 10, n. 1, p. 140–146, 2012.

NUNES, T. E. T. et al. *Acanthamoeba* and *Fusarium* interactions: A possible problem in keratitis. **Acta Tropica**, v. 157, n. 1, p. 102–107, 2016.

OMANÑA-MOLINA, M. et al. *Acanthamoeba* genotypes T3 and T4 as causative agents of amoebic keratitis in Mexico. **Parasitology Research**, v. 115, n. 2, p. 873–878, 2016.

ONICHANDRAN, S. et al. Waterborne parasites and physico-chemical assessment of selected lakes in Malaysia. **Parasitology Research**, v. 112, n. 12, p. 4185–4191, 2013.

OOI, S. S. et al. The correlation of *Acanthamoeba* from the ventilation system with other environmental parameters in commercial buildings as possible indicator for indoor air quality. **Industrial Health**, v. 55, n. 1, p. 35–45, 2017.

OSAWA, K. et al. A case of nosocomial *Legionella pneumonia* associated with a contaminated hospital cooling tower. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 20, n. 1, p. 68–70, 2014.

PAGNIER, I.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. Isolation and identification of amoeba-resisting bacteria from water in human environment by using an *Acanthamoeba polyphaga* co-culture procedure. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 1135–1144, 2008.

PALUSIŃSKA-SZYSZ, M.; CENDROWSKA-PINKOSZ, M. Pathogenicity of the family Legionellaceae. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 57, n. 4, p. 279–290, 2009.

PARIJA, S. C.; KP, D.; VENUGOPAL, H. Management of granulomatous amebic encephalitis: Laboratory diagnosis and treatment. **Tropical Parasitology**, v. 5, n. 1, p. 23–29, 2015.

PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 19, p. 1–15, 2010.

PITOUT, J. D. D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 5873–5884, 2015.

POWERS, M. E.; WARDENBURG, J. B. Igniting the fire: *Staphylococcus aureus* virulence factors in the pathogenesis of sepsis. **Plos Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 10–13, 2014.

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

QUADROS, M. E. et al. Qualidade do ar em ambientes internos hospitalares: estudo de caso e análise crítica dos padrões atuais. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 14, n. 3, p. 431–438, 2009.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, 2007.

QVARNSTROM, Y.; NERAD, T. A.; VISVESVARA, G. S. Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 1251–1265, 2013.

RAHDAR, M. et al. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains from environmental sources in Ahvaz city, Khuzestan province, southern Iran. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 7, n. 4, p. 22–26, 2012.

RASMUSSEN, R. V et al. Future challenges and treatment of *Staphylococcus aureus* bacteremia with emphasis on MRSA. **Future Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 43–56, 2011.

REDDY, P. N.; SRIRAMA, K.; DIRISALA, V. R. An update on clinical burden, diagnostic tools, and therapeutic options of *Staphylococcus aureus*. **Infectious Diseases: Research and Treatment**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2017.

REN, M.; WU, X. Evaluation of three different methods to establish animal models of *Acanthamoeba* keratitis. **Yonsei Medical Journal**, v. 51, n. 1, p. 121–127, 2010.

REYES-BATLLE, M. et al. *Acanthamoeba* genotypes T2, T4, and T11 in soil sources from El Hierro Island, Canary Islands, Spain. **Parasitology Research**, v. 115, n. 8, p. 2953–2956, 2016.

ROGERSON, A. et al. Molecular and physiological evaluation of subtropical environmental isolates of *Acanthamoeba* spp., causal agent

- of *Acanthamoeba* keratitis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 192–200, 2004.
- SAEED, A. et al. *Acanthamoeba castellanii* an environmental host for *Shigella dysenteriae* and *Shigella sonnei*. **Archives of Microbiology**, v. 191, n. 1, p. 83–88, 2009.
- SAISONGKORH, W. et al. Evidence of transfer by conjugation of type IV secretion system genes between *Bartonella* species and *Rhizobium radiobacter* in amoeba. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. 1–14, 2010.
- SALAMEH, A. et al. Fatal granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* in a patient with kidney transplant: A case report. **Open Forum Infect Disease**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2015.
- SANDSTRÖM, G.; SAEED, A.; ABD, H. *Acanthamoeba*-Bacteria: A model to study host interaction with human pathogens. **Current Drug Targets**, v. 12, n. 1, p. 936–941, 2011.
- SASAKI, T. et al. Multiplex-PCR method for species identification of. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 765–769, 2010.
- SCHEID, P. L.; SCHWARZENBERGER, R. Free-living amoebae as vectors of cryptosporidia. **Parasitology Research**, v. 109, n. 2, p. 499–504, 2011.
- SCHEID, P. Relevance of free-living amoebae as hosts for phylogenetically diverse microorganisms. **Parasitology Research**, v. 113, n. 7, p. 2407–2417, 2014.
- SCHEIKL, U. et al. Free-living amoebae and their associated bacteria in Austrian cooling towers: a 1-year routine screening. **Parasitology Research**, v. 115, n. 9, p. 3365–3374, 2016.
- SCHROEDER, J. M. et al. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1903–1911, 2001.

SCHUSTER, F. L. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 3, p. 342–354, 2002.

SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. Opportunistic amoebae: Challenges in prophylaxis and treatment. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 1, p. 41–51, 2004.

SENTE, C. et al. Occurrence and genetic characterisation of *Acanthamoeba* spp. from environmental and domestic water sources in Queen Elizabeth Protected Area, Uganda. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 127, 2016.

SHANAN, S. et al. Detection of *Vibrio cholerae* and *Acanthamoeba* species from same natural water samples collected from different cholera endemic areas in Sudan. **BMC Research Notes**, v. 4, n. 1, p. 109, 2011.

SHEEHAN, K. B.; HENSON, J. M.; FERRIS, M. J. *Legionella* species diversity in an acidic biofilm community in Yellowstone National Park. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 507–511, 2005.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 6, p. 1–13, 2012.

SIDDIQUI, R.; SAGHEER, M.; KHAN, N. A. Prevalence of *Acanthamoeba* and superbugs in a clinical setting: coincidence or hyperparasitism? **Parasitology Research**, v. 112, n. 3, p. 1349–1351, 2013.

SIDDIQUI, R. et al. Biology and pathogenesis of *Naegleria fowleri*. **Acta Tropica**, v. 164, n. 1, p. 375–394, 2016.

SNELLING, W. J. et al. Introductory remarks: Bacterial endosymbionts or pathogens of free-living amebae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5560–5571, 2005.

SOARES, S. D. S. Biodiversidade de amebas de vida livre e bactérias associadas a amebas em reservatórios de água de torres de resfriamento. 2016. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do

Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas de Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

SOLOMON, F. B. et al. Antibiotic resistant airborne bacteria and their multidrug resistance pattern at University teaching referral Hospital in South Ethiopia. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2017.

SPIPKER, T. et al. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2074–2079, 2004.

SPRINGSTON, J. P.; YOCAVITCH, L. Existence and control of *Legionella* bacteria in building water systems: A review. **Journal of Occupational and Environmental Hygiene**, v. 14, n. 2, p. 124–134, 2017.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 26, p. 15245–15250, 2001.

STEENBERGEN, J. N. et al. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 5, p. 3478–3488, 2004.

STORHARD, D. A et al. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 45–54, 1998.

TASHIRO, Y.; UCHIYAMA, H.; NOMURA, N. Multifunctional membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 6, p. 1349–1362, 2012.

THE AMERICAN SOCIETY OF HEATING, REFRIGERATING AND AIR-CONDITIONING ENGINEERS. ASHRAE Standard 62.1 - Ventilation for Acceptable Indoor Air Quality. Atlanta: ASHRAE, 2016.

THOMAS, V. et al. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 3, p. 231–259, 2010.

TICE, A. K. et al. Expansion of the molecular and morphological diversity of Acanthamoebidae (Centramoebida, Amoebozoa) and identification of a novel life cycle type within the group. **Biology Direct**, v. 11, n. 69, p. 1–21, 2016.

TODD, C. D. et al. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains from soil sources from Jamaica, West Indies. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 416–421, 2014.

TOSETTI, N.; CROXATTO, A.; GREUB, G. Amoebae as a tool to isolate new bacterial species, to discover new virulence factors and to study the host-pathogen interactions. **Microbial Pathogenesis**, v. 77, n. 1, p. 125–130, 2014.

TRABELSI, H. et al. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. **Pathologie Biologie**, v. 60, n. 6, p. 399–405, 2012.

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

VISVESVARA, G. S. Infections with free-living amebae. In: **Handbook of Clinical Neurology**. 1. ed. Atlanta: Elsevier, 2013. v.114 p.153–168.

WAEYENBERGHE, V. et al. Interaction of *Aspergillus fumigatus* conidia with *Acanthamoeba castellanii* parallels macrophage-fungus interactions. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 6, p. 819–824, 2013.

WALIA, R. et al. A case of successful treatment of cutaneous *Acanthamoeba* infection in a lung transplant recipient. **Transplant Infectious Disease**, v. 9, n. 1, p. 51–54, 2007.

WALOCHNIK, J.; OBWALLER, A.; ASPÖCK, H. Correlations between morphological, molecular biological, and physiological

characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4408–4413, 2000.

WALOCHNIK, J. et al. Granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* amoebae of genotype T2 in a human immunodeficiency virus-negative patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 338–340, 2008.

WALOCHNIK, J.; SCHEIKL, U.; HALLER-SCHÖBER, E. M. Twenty years of *Acanthamoeba* diagnostics in Austria. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 3–11, 2014.

WEISS, D. et al. A large community outbreak of Legionnaires' disease associated with a cooling tower in New York City, 2015. **Public Health Reports**, v. 132, n. 2, p. 241–250, 2017.

WHILEY, H.; TAYLOR, M. *Legionella* detection by culture and qPCR: Comparing apples and oranges. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 65–74, 2016.

WINIECKA-KRUSNELL, J. et al. Free-living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 34, n. 4, p. 253–256, 2002.

WINIECKA-KRUSNELL, J. et al. *Toxoplasma gondii*: Uptake and survival of oocysts in free-living amoebae. **Experimental Parasitology**, v. 121, n. 2, p. 124–131, 2009.

WÓJCIK-FATLA, A.; STOJEK, N. M.; DUTKIEWICZ, J. Efficacy of the detection of *Legionella* in hot and cold water samples by culture and PCR. I. Standardization of methods. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 19, n. 2, p. 289–293, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2009.

APÊNDICE A - Amostras de poeira obtidas de aparelhos de ar condicionado e isolamento de amebas de vida livre em hospital público de Florianópolis, SC (continua)

SETOR DE COLETA	NÚMERO DE COLETAS POR SETOR	AMBIENTES/ POSITIVIDADE	
Centro Ambulatorial Cirúrgico (CAC)	02	Consultório 01 F/(+)	
		Consultório 04 F/(+)	
Centro Cirúrgico (CC)	03	Sala 01 G/D/(+)	
		Sala 02 G/D/(+)	
		Sala 04 G/D/(+)	
Centro Obstétrico (CO)	03	Sala de cesária A/(-)	
		Sala de parto A/(-)	
		Centro obstétrico FC/(+)	
Clínica Cirurgia I (CCI)	03	Leito 406 G/D/(+)	
		Leito 410 G/D/(+)	
		Sala de procedimentos G/D/(+)	
Clínica Cirúrgica II (CCII)	01	Sala de curativos G/D/(+)	
Clínica Médica I (CMI)	07	309A/(+ NA)	309F/(+)
		310A/(+)	310F/(+)
		311A/(+)	311F/(+)
		Clínica médica I FC/(+)	
Clínica Médica II (CMII)	04	314 A/(+)	
		316 A/(+NA)	
		324 A/(+)	
		Clínica médica II FC/(+NA)	
Emergência (EMG)	03	Ala direita F/(+)	
		Ala esquerda F/(+)	
		Sala de reanimação F/(+)	
Esterilização (EST)	04	Arsenal A/(-)	Arsenal F/(+)
		Sala de preparo A/(-)	Sala de preparo F/(+)
Ginecologia (GIN)	04	Quarto 202 A/(+)	Quarto 202 F/(+)
		Consultório 02A/(+)	Consultório 02F/(+)

APÊNDICE A - Amostras de poeira obtidas de aparelhos de ar condicionado e isolamento de amebas de vida livre em hospital público de Florianópolis, SC (conclusão)

SETOR DE COLETA	NÚMERO DE COLETAS POR SETOR	AMBIENTES/ POSITIVIDADE	
Hemodiálise (HEM)	04	Sala de procedimentos central 1A G/D/(+)	
		Sala de procedimentos central 2A G/D/(+)	
		Sala de repouso A/(-)	Sala de repouso F/(+)
Oftalmologia (OFT)	03	Sala de espera A/(-)	Sala de espera F/(+)
		Consultório 02 F / (+)	
Pediatría (PED)	08	Sala de cuidados especiais A/(+)	Sala de cuidados especiais F/(+)
		Sala de procedimentos especiais A/(-)	Sala de procedimentos especiais F/(-)
		Sala de lactantes F/(-)	Sala de lactantes F/(-)
		Sala de lactários A/(-)	Sala de lactários F/(-)
Quimioterapia (QT)	04	Consultório 01G/D/(+)	
		Consultório 02 G/D/(+)	
		Sala de procedimentos G/D/(+)	
		Quimioterapia FC/(+)	
Unidade de Terapia Intensiva (UTI)	01	Unidade de terapia intensiva FC/(+)	
Total	54	42 (+/3NA)	

Aleta (A); Filtro (F); Filtro Central (FC); Grelha/Difusor (G/D); Não Axênicos (NA); Negativos para presença de AVL (-) Positivos para presença de AVL (+).
Fonte: Adaptado de Macedo (2016).

ANEXO A – Meio Proteose Peptona Extrato de Levedo e Glicose (PYG) pH 6,5 ± 0,2

7,5 g de Proteose peptona
0,75 g de Extrato de levedo
0,98 g de Sulfato de Magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
0,059 g de Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
1 g de Citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
0,02 g de Sulfato ferroso amoniacal [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]
0,034 g de Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)
0,355 g de Hidrogenofosfato dissódico anidro (Na_2HPO_4)
15 g de Glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)
Água destilada q.s.p 1000 mL

Preparo: Todos os componentes foram dissolvidos na ordem apresentada, com exceção do CaCl_2 que foi dissolvido separadamente e adicionado posterior ao resfriamento da solução. O pH foi ajustado em $6,5 \pm 0,2$ e a solução esterilizada por autoclavagem (121°C por 15 minutos).

ANEXO B – Ágar Não-Nutriente 1,5%

1,5 g de Ágar-Ágar
100 mL de Solução Salina de Page* (1X)

Preparo: O ágar foi dissolvido em 100 mL da solução salina, aquecido até completa dissolução e esterilizado por autoclavagem (121 °C por 15 minutos).

*Solução Salina de Page (10X)

120 mg de Cloreto de sódio (NaCl)

4 mg de Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)

142 mg de Hidrogenofosfato dissódico anidro (Na_2HPO_4)

136 mg de Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)

4 mg de Cloreto de cálcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)

Água destilada q.s.p 1000 mL

Preparo: Todos os componentes foram dissolvidos na ordem apresentada, com exceção do $CaCl_2$ que foi dissolvido separadamente e adicionado posterior ao resfriamento da solução. O pH foi ajustado em $6,5 \pm 0,2$ e a solução esterilizada por autoclavagem (121 °C por 15 minutos).