Universidade Católica de Santos

Mestrado em Saúde Coletiva

OCORRÊNCIA DE AMEBAS DE VIDA-LIVRE, DOS GÊNEROS *Acanthamoeba* E *Naegleria*, EM PISOS DE AMBIENTES INTERNOS, NA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE SANTOS, SP, BRASIL.

LAIS HELENA TEIXEIRA

Santos
2008

Universidade Católica de Santos

Mestrado em Saúde Coletiva

OCORRÊNCIA DE AMEBAS DE VIDA-LIVRE, DOS GÊNEROS *Acanthamoeba* E *Naegleria*, EM PISOS DE AMBIENTES INTERNOS, NA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE SANTOS, SP, BRASIL.

LAIS HELENA TEIXEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Saúde Coletiva da Universidade Católica de Santos para obtenção do grau de Mestre em Saúde Coletiva.
Área de concentração: Meio Ambiente e Saúde
Orientador: Profº. Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa
Co – Orientador: Profº Dr. Marcos Montani Caseiro

Santos
2008

Dados Internacionais de Catalogação
Sistema de Bibliotecas da Universidade Católica de Santos
SIBIU

T266o Teixeira, Lais Helena

Ocorrência de amebas de vida-livre, dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*, em pisos de ambientes internos, na Universidade Católica de Santos, SP, Brasil. / Lais Helena Teixeira – Santos: [s.n.], 2008.

78 f.; 30 cm. (Dissertação de Mestrado - Universidade Católica de Santos, Programa em Saúde Coletiva)

I. Teixeira, Lais Helena. II. Título.

CDU 614(043.3)

Agradecimentos

A minha mãe, Wanda Silva Rodrigues, que teve grande importância em toda a minha formação, por todo apoio, pela paciência, por todas as noites mal dormidas, e por ter sido a maior incentivadora para eu cursar este programa de Mestrado.

Ao Prof. Dr. Sergio Olavo Pinto da Costa, pela sua enorme confiança, desde o início do projeto, pela sua compreensão e paciência, e pelo incentivo para a realização e conclusão desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Marcos Montani Caseiro, pelo incentivo, pela paciência e pelo auxílio na realização da conclusão desta dissertação.

Ao Prof. Me. Rubens Moldero Filho, pelo espaço cedido no Unisantoslab para a realização das análises laboratoriais no início do projeto.

A Profª Drª Maria Luiza D. Villar, coordenadora geral dos laboratórios de Saúde, Ciências Biológicas e Exatas, da UniSantos, pelo apoio e carinho, e pelo espaço e equipamentos cedidos, para a realização das análises laboratoriais.

A minha querida amiga e colaboradora, Profª. Me. Silvana Rocha, por toda sua competência e dedicação, paciência, apoio, carinho e amizade, sem a qual não conseguiria realizar este trabalho.

A minha irmã, Anna Carolina Teixeira, pelo apoio, pela paciência e ajuda na elaboração gráfica deste trabalho, sem a qual não conseguiria.

Ao meu pai, Antonio Carlos Teixeira, e a minha irmã, Amanda Bazílio de Sousa, pelo incentivo, pelo carinho e pela torcida ao longo deste curso.

Ao meu namorado, Daniel Merlin de Andrade, por toda sua paciência e compreensão, pelo apoio, também nos momentos difíceis da realização desta pesquisa, pelo carinho e pelo incentivo.

A minha amiga batalhadora e vencedora, Adriana R. Stucchi Guimarães, por todos os momentos que passamos juntas ao longo deste curso de Mestrado, sendo bons ou ruins, pelo apoio, pelo incentivo, e por fazer valer a pena lutar por um ideal.

A toda equipe do Hexalab pelo apoio, incentivo, amizade e paciência durante o período final da realização desta dissertação.

A todas as minhas amigas, inclusive as do curso do Mestrado, aos amigos do laboratório e da faculdade e aos professores da universidade que de alguma forma me incentivaram, me apoiaram, torceram por mim e me deram carinho nos momentos que mais precisei.

A Universidade Católica de Santos pela concessão de bolsa de estudos, sem a qual eu não realizaria este curso, e pela autorização para utilização do espaço físico e equipamentos, para a realização das análises laboratoriais desta pesquisa.

Resumo

TEIXEIRA, L. H. ***Ocorrência de amebas de vida-livre, dos gêneros Acanthamoeba e Naegleria, em pisos de ambientes internos, na Universidade Católica de Santos, SP, Brasil.***

Amebas de vida-livre, particularmente as pertencentes aos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*, são amplamente distribuídas no mundo todo e têm sido consideradas como parasitas oportunísticos de humanos. Elas são resistentes a extremas condições de temperatura e de pH, bem como ao cloro e a outros tipos de desinfetantes. Cistos desidratados podem sobreviver por vários anos numa variedade de hábitats, incluindo solo, poeiras domésticas, esgoto, água fresca, água de torneira, lagos naturais e artificiais e piscinas inadequadamente (ou adequadamente) cloradas, onde as amebas podem se alimentar de bactérias contaminantes. O gênero *Acanthamoeba* pode ocorrer comensalmente na região nasofaríngea de indivíduos saudáveis, mas pode ser considerada uma infecção oportunista, ocorrendo principalmente em indivíduos debilitados, alcoólatras, doentes crônicos, pessoas submetidas a tratamento com drogas imunossupressoras e pacientes imunocomprometidos. No Brasil, já foram descritos casos de ceratites e encefalites amebianas, mas poucos são os relatos da presença delas no ambiente. O objetivo do trabalho é o de avaliar a ocorrência de amebas de vida-livre, dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*, em ambientes fechados, e para tal foi escolhido a Universidade Católica de Santos, com a finalidade de se conhecer o universo desses organismos, em lugares com alta densidade circulante de indivíduos aparentemente saudáveis. Foram coletadas 200 amostras de poeira dos pisos, no período de 5 meses, com auxílio de *swab* esterilizado, e transferidas para tubos de ensaio com 5ml de solução salina de Page, usada como transporte. Essa solução foi semeada em ágar não nutriente com 50µl de caldo BHI ou solução de Page enriquecida com *E. coli* ATCC 25922, viva, com crescimento de 18 a 24h. Os tubos foram incubados a 37ºC e a leitura foi realizada a cada 48h por até 20 dias, em microscópio óptico comum, com aumento de 400X. As amostras positivas foram repicadas para novos tubos com ágar não nutriente da mesma forma. A identificação foi feita pela observação de cistos e trofozoítas baseando-se no tipo de movimento e nos critérios morfológicos. Nas amostras analisadas, observou-se 28% de positividade com cistos e trofozoítas sugestivos para os gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria.* As amebas de vida-livre mais encontradas foram as do gênero *Acanthamoeba* provavelmente por serem organismos comensais e ubiquitários, e por apresentarem maior resistência à ação dos desinfetantes utilizados na limpeza da universidade. Já o gênero *Naegleria* foi encontrado menos frequentemente talvez por estarem associados a locais úmidos, e as amostras terem sido, em sua grande maioria, coletadas de locais secos.

Palavras-chave: AMEBAS DE VIDA-LIVRE; *ACANTHAMOEBA*; *NAEGLERIA*.

Abstract

TEIXEIRA, L. H. ***The occurrence of free-living amoeba species of the Acanthamoeba and Naegleria genera in floors of internal environments of the Universidade Católica de Santos, SP, Brazil.***

Free-living amoebas, especially the species belonging to the genus *Acanthamoeba* and *Naegleria*, are distributed worldwide, opportunistically parasiting humans. They are resistant to extreme temperature and pH conditions, as well as chlorine and some antiseptic substances. Dry cysts can survive for many years in different habitats, including soil, house dust, sewage, fresh and tap water, natural and manmade lakes and pools chlorinated or not, whenever they can feed on contaminant bacteria species. The genus *Acanthamoeba* can commensaly live in the nasopharyngeal area of healthy human individuals, causing opportunistic infections in alcoholics, immunocompromised and immunosuppressed individuals, and chronic diseased patients. Amoebic ceratitis and encephalitis cases have been described in Brasil, with almost no reports on the occurrence of such species as free-living ones. The main objective of this study was to evaluate the occurrence of free-living species of the *Acanthamoeba* and *Naegleria* amoeba genera in different closed environments of the Universidade Católica de Santos *campus*. Such environments are constantly inhabited by a high density of supposedly healthy human individuals. Two hundred samples were collected throughout a period of five months. Sterilized cotton *swabs* and test tubes containing 5mL of Page's saline solution were used for collecting and transporting samples to analysis laboratories, respectively. Each sample tube received non-nutrient Agar containing 50µl of BHI broth or Page's saline solution, enriched with living *Escherichia coli* ATCC 25922 (18-24h growth rate). Test tubes were incubated at 37ºC and assessed every 48h for a period until 20 days under 400 times magnification light microscopy. Samples containing amoeba species were transferred to new test tubes under same conditions. Species were identified through their cysts and trophozoite morphological and locomotion patterns. About 28% of the samples presented species of *Acanthamoeba* and *Naegleria* genera. *Acanthamoeba* free-living species were the most common ones, probably due to their ubiquitary, commensal habits and their resistance to most of the campus commonly used antiseptic cleaning products. On the other hand, species of *Naegleria* genus were less frequent in the analyzed samples. Probably, because these species are naturally associated to moist environments and samples were mostly collected from dry places.

Palavras-chave: FREE-LIVING AMOEBAS; *ACANTHAMOEBA*; *NAEGLERIA*.

Lista de figuras, quadros e gráficos

Figura 01: Material preparado para incubação em estufa bacteriológica 40

Gráfico 01: Percentagem das amostras positivas para os gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*, coletadas nos dois *campi* escolhidos da Universidade 43

Quadro 01: Número e percentual de amostras positivas para amebas do gênero *Acanthamoeba,* coletadas em diferentes locais no *campus* Dom Idílio José Soares 43

Quadro 02: Número e percentual de amostras positivas para amebas do gênero *Naegleria*, coletadas em diferentes locais no *campus* Dom Idílio José Soares 44

Quadro 03**:** Número e percentual de amostras positivas para amebas dos dois gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*, encontrados na mesma amostra, em diferentes locais no *campus* Dom Idílio José Soares 44

Figura 02: AVL no *campus* Dom Idílio José Soares 44

Quadro 04: Número e percentual de amostras positivas para amebas do gênero *Acanthamoeba,* coletadas em diferentes locais no *campus* Vila Nova 45

Quadro 05: Número e percentual de amostras positivas para amebas do gênero *Naegleria*, coletadas em diferentes locais no *campus* Vila Nova 45

Quadro 06: Número e percentual de amostras positivas para amebas dos dois gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*, encontrados na mesma amostra, em diferentes locais do *campus* Vila Nova 46

Figura 03: AVL no *campus* Vila Nova 46

Figura 04: Morfologia típica de cistos de *Acanthamoeba* spp. (400X) 47

Figura 05: Formas trofozoíticas de *Acanthamoeba* spp. (400X) 47

Figura 06: Trofozoíto característico de *Naegleria* spp. (400X) 47

Figura 07: Cistos de *Naegleria* spp. (400X) 47

Quadro 07: Resultado da presença de amebas de vida-livre, nas amostras de poeiras coletadas em cada *campus* pesquisado, e a característica do local 48

Gráfico 02: Variação da temperatura ambiental durante os meses de coleta, e a percentagem da ocorrência das amebas de vida-livre dos gêneros escolhidos 49

Lista de abreviaturas

AVL	Amebas de vida livre
SNC	Sistema Nervoso Central
MEAP	Meningoencefalite amebiana primária
EGA	Encefalite granulomatosa amebiana
CA	Ceratite amebiana
µm	Micrômetro
µg	Micrograma
µl	Microlitro
ml	Mililitro
NaCl	Cloreto de Sódio
KCl	Cloreto de Potássio
$CaCl_2$	Cloreto de Cálcio
pH	Potencial hidrogeniônico
mm	Milímetro
CO_2	Gás Carbônico
LiCl	Cloreto de Lítio
$MgCl_2$	Cloreto de Magnésio
PPYG	Proteose peptona, extrato de levedura e glicose
PYG	Peptona, extrato de levedura e glicose
m^2	Metro quadrado
atm	Atmosfera
ATCC	American Type Culture Collection

Sumário

1. Introdução 11

1.2. Morfologia e biologia das Amebas de Vida Livre (AVL) 13

1. 2. 1. Gêneros *Acanthamoeba* 14

1. 2. 2. Morfologia do gênero *Acanthamoeba* 16

1. 2. 3. Gênero *Naegleria* 19

1. 2. 4. Morfologia do gênero *Naegleria* 22

1. 3. Cultivo das amebas de vida-livre: Gêneros *Acanthamoeba e Naegleria* 25

1. 4. Interação AVL com bactérias 27

2. Justificativa 28

3. Objetivo geral 29

3. 1. Objetivos secundários 29

4. Material e métodos 30

4. 1. Região estudada: A Universidade 30

4. 2. Amostragem 32

4. 2.1. *Campus* Dom Idílio 33

4. 2. 2. *Campus* Vila Nova 37

4. 3. Procedimentos 39

4. 4. Análise laboratorial 41

5. Resultados 42

5. 1. Análise dos dados 42

6. Discussão 50

7. Referências Bibliográficas 57

8. Anexos 78

1. Introdução

As amebas de vida-livre (AVL) são amplamente distribuídas no solo e na água, particularmente membros dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*. Em contraste a infecções gastroentéricas causadas por amebas parasitárias como a *Entamoeba histolytica,* um número relativamente pequeno de infecções são causadas pelas AVL. Os representantes dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria* são patogênicos, mas não parasitários. Eles causam doença por estarem no lugar certo e na hora certa ou por se aproveitarem da imunidade prejudicada. Em outras palavras, eles são patogênicos oportunistas. Um número de revisões está disponível na literatura para se conhecer a biologia e o potencial patogênico destas amebas (SCHUSTER, 2002).

A associação homem–AVL não constitui ainda uma verdadeira relação parasita-hospedeiro. As amebas têm o ambiente como seu habitat natural, e só algumas espécies eventualmente atingem o homem, apresentando reversibilidade de vida jamais vista em seres estritamente parasitas. Pode-se estar diante de um complexo de protozoários em transição para a vida parasitária e seu estudo deve levar a interessantes caminhos para a compreensão de mecanismos patogênicos (CIMERMAN, 2001).

Sabe-se hoje que algumas espécies de amebas de vida-livre podem comportar-se como parasitas facultativos de seres humanos e de animais domésticos. Elas podem invadir o sistema nervoso central e outros órgãos, causando morte ou incapacidade permanente (GIAZZI, 1996; MARTINEZ, 1985). Contudo, estes protozoários passaram a integrar a parasitologia médica, embora seu papel ainda não esteja corretamente dimensionado (CIMERMAN, 2001).

A caracterização destas amebas como agentes etiológicos de doenças só foi possível graças aos trabalhos pioneiros de Culbertson, em 1958, que, após a descoberta casual de uma ameba com efeito citolítico em culturas de tecido, estabeleceu um modelo de meningoencefalite em animais de laboratório, aventando a possibilidade do aparecimento da doença na espécie humana (CIMERMAN, 2001).

Pequenas amebas de vida-livre pertencentes aos gêneros *Naegleria*, *Hartmannella*, e *Acanthamoeba* são comumente encontradas no solo, água fresca, e mesmo no esgoto e na lama (KROGSTAD *et al*.,1991). Outras ainda pouco conhecidas como *Balamuthia mandrillaris* (família Acanthamoebidae), e *Sappinia diploidea,* também são encontradas nestes ambientes, e também estão associadas com doenças do SNC de humanos (GELMAN *et al.*, 2001; VISVESVARA *et al.,* 1993). Estes organismos também podem habitar lagos e lagoas, piscinas, solos humíferos, esgotos e cursos de água que recebem efluentes industriais, em todos os continentes e climas (REY, 2001).

Somente uma espécie de *Naegleria, N. fowleri*, algumas de *Acanthamoeba* (*A. castellani, A culbertsoni, A. hatchetti, A. healyi, A. polyphaga, A. rhysodes, A. astronyxis, A. divionensis*) e a única espécie conhecida de *Balamuthia, B. mandrillaris*, sabe-se que causam enfermidades (IREZÁBAL, 2005).

A espécie *Naegleria fowleri* é reconhecida como o agente da meningoencefalite amebiana primária (MEAP), infecção que acomete jovens e é quase sempre fatal. Espécies dos gêneros *Acanthamoeba* e *Balamuthia* são agentes da encefalite granulomatosa amebiana (EGA). Além da EGA, a *Acanthamoeba* produz quadros clínicos muito diversos, principalmente a ceratite amebiana (CA), que são lesões ulceradas da córnea (DE CARLI, 2001).

Há cinco componentes de considerável importância na determinação da infecção por AVL: temperatura, capacidade de persistir nas mucosas, imunidade de mucosas, imunodeficiência e dose infectante (FERRANTE, 1991).

Naegleria e *Acanthamoeba* podem ser cultivadas axenicamente em meios de cultura livre de células ou em cultura de tecidos celulares, e em culturas com bactérias como fonte de alimento. Estes meios de cultura podem tanto ser o ágar não nutriente como um ágar contendo baixa concentração de nutrientes (peptona 0,05%, extrato de levedura 0,05% e glicose 0,1%) na presença de bactérias vivas ou mortas. Em geral são escolhidas como alimento, cepas de bactérias não mucóides como *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. e *Escherichia coli*. A presença da cápsula mucóide no entorno da bactéria impede a fagocitose delas pelas amebas e leva ao crescimento excessivo da população bacteriana perante a amebiana (SCHUSTER, 2002).

Como a maioria dos médicos desconhece o problema, e a notificação não é obrigatória, difícil se torna saber a verdadeira incidência das infecções do SNC por AVL. Até outubro de 1996, as comunicações de infecções causadas por *Naegleria fowleri* eram 179 (81 só nos Estados Unidos), e de EGA (166 casos) 103 atribuídos a espécies de *Acanthamoeba* e 63 a *Balamuthia mandrillaris* (MARTINEZ, 1997).

1. 2. Morfologia e Biologia das Amebas de vida-livre (AVL)

Os seres vivos de um modo geral foram agrupados e classificados cientificamente de acordo com as características morfológicas partilhadas entre as espécies, características filogenéticas. Estes agrupamentos foram alterados múltiplas vezes para melhorar a consistência da classificação, e de acordo com o

advento da sistemática molecular, é muito provável que estas alterações taxonómicas continuem a ocorrer.

A classificação taxonómica mais moderna tem suas raízes no sistema de classificação de Carolus Linnaeus proposta no século XVIII.

Segundo Cavalier-Smith (2002, 2003) as amebas de vida-livre pertencem ao domínio *Eukaryota* e ao reino *Protozoa.* O gênero *Acanthamoeba* está classificado da seguinte forma: subreino *Gymnomyxa*; infrareino *Sarcomastigota*; filo *Amoebozoa*; subfilo *Lobosa*; família *Acanthamoebidae*. O gênero *Naegleria* está classificado da seguinte forma: subreino *Corticata*; infrareino *Excavata*; superfilo *Discicristata*; filo *Percolozoa*; classe *Heterolobosea*; ordem *Schizopyrenida*.

1. 2.1. Gênero *Acanthamoeba*

As espécies que representam este gênero estão entre os protozoários mais encontrados no ambiente. Estão distribuídas por todo o mundo sendo isoladas no solo, poeira, água natural e tratada, água do mar, piscinas, lamas, sedimentos, aparelhos de ar-condicionado, águas domésticas, águas para beber tratadas com plantas, águas engarrafadas, unidades de tratamento dentário, unidades de diálises e hospitais, colírio e lentes de contato que no caso tenham contaminantes como bactérias ou leveduras ou culturas de células de mamíferos (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003).

Acanthamoeba spp. podem ser isoladas da vegetação, de animais incluindo peixes, anfíbios, répteis, e mamíferos, da mucosa nasal e da garganta de humanos, de cérebro infectado e tecido de pulmão, de lesões de pele de pacientes

imunossuprimidos, e de tecidos da córnea de pacientes com ceratite amebiana (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003).

O ciclo de vida deste gênero divide-se em dois estágios: um onde se alimenta ativamente, na forma de trofozoíta, e outro dormente na forma de cisto. Os trofozoítas variam no tamanho de 25 a 40 µm e se alimentam no ambiente, de bactérias, algas, e leveduras, mas também podem existir axenicamente em líquidos com nutrientes, e se alimentarem através de pinocitose (BOWERS, 1977; BOWERS & OLSZWSKI, 1983). A captura de alimento pelo trofozoíta pode ocorrer pela formação de pseudópodes e por fagocitose ou através da formação de estruturas temporárias na sua superfície em forma de ventosas para auxiliar na ingestão da partícula em questão, sejam elas bactérias, leveduras ou células (PETTIT, 1996). A locomoção envolve a formação de um pseudópode hialino que é lento em todas as espécies de *Acanthamoeba* (PRESTON & KING, 1984). Uma espécie, *A. castellanii*, foi usada extensivamente para estudar os mecanismos moleculares da ação polimerizante durante a locomoção amebóide (KONG & POLLARD, 2002; POLLARD & OSTAP, 1996).

A resistência de cistos de *Acanthamoeba* a tratamento por ultravioleta é 15 vezes maior do que *Escherichia coli*, mas as técnicas usuais de esterilização de instrumental cirúrgico matam trofozoítos e cistos de amebas (MEISLER, 1985).

A resistência ao cloro e a outros produtos de desinfecção de piscinas é característica digna de registro, considerando-se que somente altas doses de cloro ativo são capazes de matar amebas na forma trofozoítica, sendo que as císticas são extremamente resistentes (DE JONKHEERE, 1991; VISVESVARA & STHER-GREEN, 1990).

1. 2. 2. Morfologia do gênero *Acanthamoeba*

A organização celular das *Acanthamoeba* tem sido estudada através da microscopia eletrônica (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003).

Foram identificadas nas *Acanthamoeba* um grande número de organelas celulares tipicamente de organismos eucariontes. Bowers & Korn (1968) observaram a presença de um complexo de Golgi, de retículos endoplasmáticos lisos e rugosos, ribossomos livres, vacúolos digestivos, mitocôndria, e microtubulos em trofozoítas de *Acanthamoeba.*

Uma membrana plasmática trilaminar circunda o conteúdo do citoplasma do trofozoíta, possuindo projeções espinhosas, em sua superfície, chamadas de acanthopodia. No citoplasma está presente um vacúolo contrátil proeminente, que controla o conteúdo de água da célula, e um núcleo com um grande nucléolo central. Geralmente as amebas são mononucleares, embora células multinucleares sejam comuns quando as *Acanthamoebas* são mantidas em cultura de suspensão. A reprodução ocorre por fissão binária (BYERS,1979; PAGE, 1967).

O cisto possui parede dupla e enrugada composta de um ectocisto e um endocisto com tamanhos entre 13 e 20 µm que varia de espécie para espécie (BOWERS & KORN, 1969). A formação do cisto ocorre sob condições ambientais adversas tais como, privação de alimentos, dessecação, e mudanças de temperatura e de pH (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003). Villemez e colaboradores (1985) relataram que um anticorpo obrigatório de uma proteína específica da membrana também causa encistamento de *A. castellanii*.

Os cistos são resistentes a biocidas, cloração, e antibióticos (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003) e sobrevivem a baixas temperaturas (0 a 2ºC) (BROWN

& CURSONS,1977). Meisler *et al*. (1985), entretanto, mostrou que o tratamento com Freon ou óxido de metileno, ou com esterilização em autoclave, destruía os cistos. Excistamento ocorre sob condições ambientais convenientes quando trofozoíta emerge do cisto. Mazur *et al.* (1995) demonstraram que cistos dessas amebas permaneceram viáveis por mais de 24 anos depois de terem sido armazenados em água com temperatura de 4ºC. De 17 amostras ambientais isoladas de *A. polyphaga* ou *A. castellanii* que se mantiveram como cistos, 14 deram origem a trofozoítas quando inoculados em agar não nutriente contendo bactéria. Depois do processo de excistamento, a patogenicidade das amebas foi testada, através da inoculação intranasal em camundongos. Poucas mortes de camundongos, que foram inoculados com amebas encistadas por mais de 24 anos, foram registradas, comparando-se com camundongos inoculados com a mesma amostra ambiental quando testados inicialmente (MAZUR, HADAS, & IWANICKA, 1995). Assim, embora a virulência tenha se mostrado em declínio com o passar do tempo, os camundongos retiveram a patogenicidade das amostras ambientais. O trofozoíta das *Acanthamoeba* pode ser induzido a se transformar em cisto no agar não nutriente e a excistação ocorre sob condições favoráveis, estas amebas tem sido usadas para estudar diferenciação.

O gênero *Acanthamoeba f*oi descrito primeiramente por Castellani quando relatou a presença de uma ameba em cultura de *Cryptococcus pararoseus* (CASTELLANI, 1930). O gênero foi alocado na família Acanthamoebidae, e foi estabelecido mais tarde, em 1931, por Volkonsky, mas a classificação atual dos organismos do gênero está atualmente sob revisão (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003).

A identificação das *Acanthamoeba* em nível de gênero é relativamente fácil devido a presença de projeções espinhosas na superfície dos trofozoítas, chamadas de acanthopodia. No entanto, usando critérios morfológicos, a identificação destas amebas em nível de espécie tem sido difícil. *Acanthamoeba* spp. foi colocado em três grupos morfológicos, I, II e III, baseados no tamanho e na forma do cisto (PAGE, 1967; PUSSARD & PONS, 1977). As espécies do grupo I foram designadas por terem um cisto grande em relação às espécies dos outros grupos. As espécies do grupo II foram caracterizadas como tendo um ectocisto enrugado e um endocisto que pode ser estrelado, poligonal, triangular ou oval. As espécies do grupo III exibiram tipicamente um ectocisto fino e liso, e um endocisto redondo. Apesar disso, a classificação das *Acanthamoeba* baseada na morfologia da parede do cisto provou ser incerta, pois a morfologia do cisto pode mudar de acordo com as condições da cultura (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003).

Critérios imunológicos, bioquímicos e fisiológicos também têm sido aplicados na identificação das diferentes espécies de *Acanthamoeba* (MARCIANO-CABRAL & CABRAL, 2003).

Por razões ainda desconhecidas, *Acanthamoeba*, mais do que qualquer outra AVL presente no solo, pode frequentemente abrigar bactérias endossimbiônticas (SCHUSTER, 2002).

Uma das bactérias patogênicas ou potencialmente patogênicas que vêm sendo descrita em associação com *Acanthamoeba* spp., é a *Escherichia coli* sorotipo O 157 (BARKER *et al.*, 1999).

1. 2. 3. Gênero *Naegleria*

Embora AVL possam viver sob as mais variadas faixas de temperatura, os protozoários do gênero *Naegleria* são considerados termofílicos, decorrendo deste fato seu encontro muito freqüente em coleções de águas aquecidas, natural ou artificialmente, como piscinas e canais de fábricas, submetidas à poluição térmica (DE JONKHEERE & VAN DE VOORDE, 1977).

Caracterizam-se por apresentarem três formas evolutivas durante o ciclo vital. A forma trofozoítica mostra movimentação rápida, através de pseudópodes, tipo lobópode, medindo de 8 a 15 µm e tendo apenas um núcleo. A forma cística, de resistência a ambientes adversos, medindo de 7 a 12 µm, com paredes lisas e poros. A forma flagelar, com dois flagelos, de aparecimento fulgaz (CIMERMAN, 2001).

A transformação de trofozoíto em flagelado, peculiar a amebas deste gênero, é uma característica utilizável para fins diagnósticos, já que, sob determinadas condições pode ser induzida em laboratório (CIMERMAN, 2001). Quando colocados em água destilada, alguns deles se transformam, horas depois, em organismos biflagelados. A infecção humana é denominada naegleríase (DE CARLI, 2001).

O gênero *Naegleria* está associado com a meningoencefalite amebiana primária (MEAP), uma infecção rápida fulminante, do sistema nervoso central (SNC), tendo como agente causal da maioria destas infecções a *Naegleria fowleri* (SCHUSTER, 2002).

A meningoencefalite amebiana primária causada por este microrganismo é uma patologia aguda infrequente, na qual pode evoluir a um quadro de morte num

período curto. Em geral, estes casos se diagnosticam erroneamente como meningite bacteriana e são tratados com a procedência incorreta (PETIT, 2006).

Frequentemente estas amebas infectam crianças e adolescentes, quase sempre relacionados a antecedentes de prática de natação ou de jogos em fontes de água doce (PETIT, 2006).

As amebas do gênero *Naegleria* penetram na mucosa nasal, por aspiração de poeira ou água contaminada com trofozoítas ou cistos, onde são fagocitadas pelas células de sustentação do epitélio neuro-olfativo e atravessam a placa cribosa do etmóide pela bainha amielínica do nervo olfativo. Chegam depois ao bulbo e lobo olfativos e daí a todo o encéfalo (DE CARLI, 2001).

Os sinais e sintomas aparecem no período de 2 – 5 dias posteriores à exposição, e o curso da enfermidade é fulminante com índice de mortalidade de 95% nos sete próximos dias que seguem após o início do quadro clínico (PETIT, 2006).

A clínica desta enfermidade é muito confundida com a clínica das meningoencefalites de origem viral ou bacteriana, e na maioria dos casos, o diagnóstico só é realizado após a morte do paciente. Como agravante, sabemos que em muitos países, é mínima ou nula a prática de necropsias. No diagnóstico de infecção no sistema nervoso central, nos casos de meningoencefalite, e que não seja por bactéria, deve-se suspeitar que a infecção possa ser por amebas de vida-livre. Nestes casos, é primordial examinar o líquido cefalorraquidiano a fresco, para evidenciar as amebas em movimento (PETIT, 2006).

Estudos sobre os efeitos do cloro livre e do elemento Iodo sobre *Naegleria* spp. mostraram que estes vêm sendo indicados como dois halogênios com atividade cisticida similar. Cloro livre a 0,5 µg/ml prontamente mata cistos de *Naegleria*,

enquanto baixas doses são conhecidas por destruir o estágio de trofozoíta (DE JONCKHEERE & VAN DE VOORDE, 1976; RUBIN *et al*., 1983). Acima de 3,4 µg/ml de Iodo é mais cisticida que o cloro livre (CHANG, 1978). Um estudo comparativo da capacidade amebicida do cloro, do dióxido de cloro, do ozônio, do Deciquam 222, e do Baquacil (polihexametileno biquanide hidroclorídrico) vem sendo avaliado. Todos os cinco desinfetantes possuem atividades amebicidas que dependem das características físicas e químicas da água que foram tratados (CURSONS *et al*., 1980; DAWSON *et al*., 1983).

O efeito de vários fatores físicos do crescimento e desenvolvimento de *Naegleria* spp. vem sendo estudado. Estas amebas toleram relativamente grande variação de pH (4,6 a 9,5) *in vitro* (CARTER, 1970; KYLE & NOBLET, 1985). Também possuem tolerância a altas temperaturas quando comparadas a outras AVL. Cepas de *Naegleria fowleri* isoladas de infecções humanas crescem prontamente a 45ºC (GRIFFIN, 1972, 1978). As amebas e cistos podem tolerar temperaturas elevadas (65ºC) por curtos períodos de tempo (1 a 3 minutos) (CHANG, 1978). Cerva demonstrou que as temperaturas abaixo de 20ºC inibem a multiplicação *in vitro* de *Naegleria fowleri* (CERVA, 1977). Trofozoítas de *Naegleria fowleri* vêm sendo relatados com estado de degeneração quando submetidos a temperaturas abaixo de 10ºC (CHANG, 1978).

Naegleria fowleri não tolera alta salinidade assim como as amebas que não formam estágio flagelar. A maioria das cepas de *Naegleria fowleri* tolera 0,5% a 1% de NaCl (GRIFFIN, 1983). Entretanto, crescimento de algumas cepas destas amebas são inibidas a 0,2% de NaCl e $KCl.CaCl_2$ estimulando encistamento (KADLEC, 1975).

1. 2. 4. Morfologia do gênero *Naegleria*

Os protozoários deste gênero apresentam em seu ciclo evolutivo três estágios de vida, a forma trofozoítica, a forma cística e a forma flagelar.

O trofozoíto é o estágio vegetativo ou de alimentação. Exibem uma estrutura chamada de citossoma (food cups), com extensões citoplasmáticas na superfície. Estas estruturas funcionam como “bocas”, e variam de acordo com o tamanho da ameba, e seu número depende da espécie e da linhagem (cepa) da *Naegleria*. São usadas para ingerir bactérias, células leveduriformes, vestígios celulares, e também servem como acessório para algumas organelas (JOHN *et al*., 1985; LATTYAK *et al*.,1985; MARCIANO-CABRAL & FULFORD, 1986; MARCIANO-CABRAL & JOHN, 1983).

Naegleria fowleri na forma trofozoítica é uma pequena ameba medindo de 10 a 35 μm; exibe uma locomoção eruptiva produzindo uma protuberância lisa hemisférica. Na parte posterior, chamada uróide, aparece frequentemente vestígio de filamentos esponjosos. Durante o ciclo de vida, produzem forma biflagelada transitória por conta da alteração das condições ambientais e uma parede lisa quando cisto (GRIFFIN, 1978; JOHN, 1982; SINGH, 1975).

Os flagelados não possuem citossoma. Os cistos, dos representantes deste gênero, são usualmente esféricos medindo de 7 a 15 μm, e a parede destes possui 1 ou mais poros tampados com material mucóide (BRINN, 1883).

Em nível ultraestrutural, os trofozoítas de *Naegleria* exibem típicas características de células eucariontes, com exceção dos centríolos que já foram observados (FULTON & DINGLE, 1971; SCHUSTER, 1963). A ameba é envolvida por uma única membrana (10 nm de largura) composta de duas densas camadas

incluindo um espaço claro (SCHUSTER, 1963). Grande número de ribossomos, livres e assessorando o retículo endoplasmático, sendo encontrado disperso no citoplasma. Um retículo endoplasmático liso e um primitivo complexo de Golgi, feito por componentes membranosos e vesículas revestidas, também estão presentes (STEVENS *et al*., 1980). Foram também observadas, em *Naegleria* spp., numerosas membranas-limite de organelas citoplasmáticas (PATTERSON *et al*., 1981). A mitocôndria observada nestas amebas possui forma de xícaras e halteres (CAROSI *et al*., 1977; PATTERSON *et al*., 1981; SCHUSTER, 1963, 1979). Lisossomas primários e secundários identificados pela mancha de ácido fosfatase, estão dispersos pelo citoplasma (FELDMAN, 1977). Vacúolos contrácteis também foram identificados na região posterior ou uróide de *Naegleria* spp. (SCHUSTER, 1963; VICKERMAN, 1962).

O núcleo de *Naegleria* spp. é proeminente e contém núcleos conspícuos ou endossoma. O envelope nuclear é típico dos eucariontes e contém numerosos poros. A outra membrana do envelope nuclear de *N. fowleri, N. gruberi* e *N. jadini* está revestida com ribossomos (CAROSI *et al*., 1977; STEVENS *et al*., 1978,1980).

As amebas do gênero *Naegleria* exibem um predominante padrão de locomoção. A superfície das células, que se modificam durante a locomoção, vem sendo estudada em *N. gruberi.*

Alguns estudos têm demonstrado que a renovação da membrana plasmática não é exigida para a movimentação das amebas. Aderir a um substrato, entretanto, é essencial para a locomoção. Esta dependência de aderir ao substrato foi reconhecida baseada na reflexão de interferência no microscópio na interação da ameba com o substrato do vidro (KING *et al*., 1979, 1983; PRESTON & KING, 1978). O movimento da ameba de aderência fraca ou forte numa superfície de vidro vem

sendo investigado. Em água deionizada *N. gruberi* desenvolve uma fraca aderência célula-substrato (KING et al., 1979,1983).

O índice de migração e movimento de *Naegleria* spp. vêm sendo examinados por vários pesquisadores (ROWBURY *et al*., 1983). O índice de migração da ameba, se termotolerante ou não, depende da temperatura. No agar não nutriente com cultura de *Escherichia coli, N. fowleri* se locomove de 1 a 3 mm/dia a 23º C, de 7 a 14 mm/dia a 37º C e de 7 a 18 mm/dia a 43º C.

Quando as amebas estão incubadas em solução tampão nutriente, modificam-se de organismos que se reproduzem e se alimentam, para um estágio transitório, onde não se reproduzem não se alimentam e são flagelados. Diferenciação durante a fase flagelar envolve mudanças na forma da célula e, mudança na síntese de todas as organelas do aparelho flagelar (MARCIANO-CABRAL, 1988).

O estágio de cisto tem recurso para proteger contra dessecação e privação de alimento. Através da microscopia eletrônica foram demonstradas diferenças nas paredes dos cistos de *N. gruberi, N. fowleri* e *N. jadini (*SCHUSTER, 1975; STEVENS *et al*., 1978). No cisto maduro de *N. gruberi* está incluído uma dupla parede com estrutura espessa em torno de 20 µm que é composta por mucopolissacarídeos (SCHUSTER, 1963). A outra camada da parede do cisto de *N. gruberi* está ausente em *N. fowleri* e *N. jadini. Naegleria* spp. exibem poros na parede do cisto.

As amebas, quando no estágio flagelar, sofrem encistamento. Fatores que induzem a formação do cisto incluem privação do alimento, dessecação, acúmulo de produtos desperdiçados, exposição a produtos do metabolismo de bactéria, falta de oxigênio, mudança de pH, e concentração salina (CHANG, 1974, 1978; SINGH,

1975; SINGH & DUTTA, 1984). Encistamento de *Naegleria* spp. implica na formação da parede do cisto, expulsão de água através de vacúolos contráteis e reorganização do citoplasma (SCHUSTER, 1979; SCHUSTER & SVIHLA, 1968). Apesar da exata condição de indução de encistamento no ambiente estar definida, a formação do cisto em laboratório vem sendo mostrada como ocorrendo em líquido axênico e cultura contendo bactérias. *N. fowleri e N gruberi* crescem em associação com *E. coli* viva formando cisto (DE JONCKHEERE & VAN DE VOORDE, 1976).

Os cistos são formados também, quando *N. fowleri* está crescendo em agar suplementado com *Klebsiella aerogenes* (WARHURST *et al*., 1980). Certamente compostos químicos vêm demostrando aumento no encistamento. Por exemplo, formação de cisto de *N. fowleri* é promovida num meio contendo $2X10^{-3}$ M de $CaCl_2$ (KADLEC, 1975).

Sinais de excistamento incluem adição de água em meio de cultura fresco (SCHUSTER, 1963), a presença de bactérias, e CO_2 (AVERNER & FULTON, 1966).

Cistos de algumas cepas de *Naegleria gruberi* excistam em elevados níveis de CO_2 enquanto outras cepas excistam quando colocadas em água fresca ambientada, como água e meio. Excistamento de *N. gruberi* também foi induzido pela exposição do cisto a altas pressões hidrostáticas (TODD & KITCHING, 1973).

1.3. Cultivo das Amebas de vida-livre: Gêneros *Acanthamoeba e Naegleria*

O gênero *Acanthamoeba* é mais capaz de tolerar as condições do meio para crescimento do que o gênero *Naegleria*. Parecem ser menos exigentes, nutricionalmente, crescendo em culturas axênicas ou com crescimento bacteriano

sem adaptação prolongada ou sem muita seleção, o que não ocorre com *Naegleria* (SCHUSTER, 2002).

O gênero *Naegleria* cresce axenicamente em meio de cultura enriquecido contendo peptona proteose ou peptona, extrato de levedura, concentrado de fígado, e suplementos adicionais. Estes suplementos incluem soro de bezerro, bactéria morta, extrato de embrião de frango, ácido fólico (SCHUSTER, 2002).

Outro meio de cultura que é utilizado como suporte no crescimento de *Naegleria* patogênica foi desenvolvido por Nelson e consiste de glicose (1,0g), infusão de fígado ou fígado digerido (2,0g), soro fetal de bezerro (50,0ml), e água destilada (450,0ml) (pH 6,5). O meio foi modificado de sua original formulação porque alguns componentes são indisponíveis (WEIK & JOHN, 1977; WONG *et al*., 1975).

O meio de cultura básico para o crescimento de *Acanthamoeba* spp. consiste em peptona proteose, extrato de levedura, e glicose conhecido como PPYG ou PYG, respectivamente (SCHUSTER, 2002).

O procedimento para o crescimento tanto de *Acanthamoeba* spp. quanto de *Naegleria* spp., através de isolados clínicos, é utilizar o agar não nutriente semeado com *E. coli* ou alguma bactéria não mucóide (JONH, 1993; VISVESVARA, 1999).

As amebas se alimentam de bactérias que crescem cobrindo a superfície do agar, no período de 1 a 2 dias, com temperatura em torno de 37ºC. A confirmação da presença destas amebas pode ser feita examinando-se a superfície do ágar, quando semeados em placas, utilizando um microscópio invertido, ou, quando se utilizar um microscópio convencional, deve-se inverter as placas para se observar a superfície do agar, focando-a com auxílio da objetiva de aumento de 10X (SCHUSTER, 2002).

Para induzir a formação de flagelos em *Naegleria* spp., no seu estágio transitório, utilizamos a técnica de exflagelação, onde a transformação da ameba em flagelada ocorre quando a ameba é transferida do meio de crescimento para água destilada podendo ser suprimida pelo KCl, NaCL, LiCl, $CaCl_2$ ou $MgCl_2$ (BURBIDGE *et al*., 1984). Incuba-se em estufa bacteriológica a 37ºC por um período de 2 a 24 horas.

1. 4. Interação AVL com bactérias

Espécies de amebas de vida-livre podem conter microrganismos endossimbiônticos, veiculando-os no ambiente. Um aspecto importante é a possibilidade de associação entre algumas espécies de amebas de vida-livre e bactérias. Várias espécies de bactérias patogênicas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Legionella* spp., *Listeria monocytogenes*, entre outras, foram observadas no interior de amebas de vida-livre (WALOCHNIK *et al*., 1999).

O gênero *Acanthamoeba,* também tem sido implicado como veículo de várias bactérias patogênicas, como por exemplo, *Legionella* spp., entre outros endossimbiônticos (SILVA, 2001).

Aspecto interessante na epidemiologia é a interação de AVL e *Legionnella pneumophila* (ROWBOTHAM, 1980), bactéria causadora da doença dos legionários. Foi demonstrado, experimentalmente, que a bactéria consegue sobreviver no citoplasma dos protozoários, em determinadas condições de temperatura. Pode ser que este fato explique a transmissão de *L. pneumophila*, uma vez que se sabe que a bactéria não tem condições de sobrevivência em forma livre no ambiente (CIMERMAN, 2001).

2. Justificativa

Amebas de vida-livre são organismos ubiquitários e comensais, se alimentam de bactérias, como *Escherichia coli*, microrganismo comum no ambiente e na microbiota humana.

Estas espécies de protozoários são consideradas patogênicas oportunistas podendo causar doenças como ceratites, principalmente em usuários de lentes de contato, lesões de pele, sinusites e até outras doenças mais sérias, como é o caso de meningoencefalites e lesões no sistema nervoso central levando o paciente, em pouco tempo, ao óbito.

Na literatura são raros os trabalhos sobre a ocorrência de AVL em ambientes internos no Brasil.

Devido o ambiente universitário ser constantemente freqüentado por um grande número de pessoas, entre alunos e funcionários com diversas funções, que transitam na universidade durante todos os períodos do dia, e estas estarem frequentemente expostas a estes microrganismos ambientais e oportunistas, a investigação sobre a ocorrência destes organismos de vida-livre pode ser significativa e importante para avaliar o nível de exposição de quem freqüenta estes locais.

A dificuldade dos profissionais da saúde, principalmente médicos, em diagnosticar a presença de amebas de vida-livre em doenças, desperta o interesse para que se pesquise a existência destes organismos, e se utilize uma metodologia facilitada e simplificada a fim de reconhecer os mesmos, através de suas características morfológicas e de locomoção. Os laboratórios de Saúde Pública e

patologias clínicas usualmente não dispõem de metodologias para diagnosticar AVL ambientais em doentes.

3. Objetivo geral

Avaliar a ocorrência de amebas de vida-livre, dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*, em ambientes internos, com a finalidade de se conhecer o universo desses organismos, através de amostragem aleatória de poeiras dos pisos da Universidade Católica de Santos.

3. 1. Objetivos secundários

Conhecer a distribuição de amebas de vida-livre em pisos de ambientes internos onde circula uma população aparentemente saudável.

Despertar a atenção dos profissionais da saúde para a ocorrência de amebas de vida-livre, mostrar a importância da investigação através de um diagnóstico mais apurado, nas doenças que também podem ser causadas por elas.

Auxiliar no diagnóstico destes organismos, através de uma metodologia, usada como ferramenta facilitadora para tal.

4. Material e Métodos

4.1. Região estudada: A Universidade

A Universidade Católica de Santos, Unisantos, é uma das principais e mais conceituadas universidades da baixada santista. Situa-se na cidade de Santos, São Paulo.

Atualmente está formada por cinco centros de ensino, mantendo 29 cursos de graduação, 6 cursos sequenciais, 5 cursos de pós-graduação *Stricto sensu,* cursos de especialização, aperfeiçoamento e extensão, setores voltados para a ciência e as artes. Além disso, mantém a Universidade Aberta Para a Terceira Idade.

Os locais escolhidos para a pesquisa foram dois dos *campi* da universidade: *campus* Dom Idílio José Soares, o mais novo de todos, inaugurado no ano de 2003, alocado no bairro Vila Mathias, com uma área total construída de aproximadamente 7768m^2, onde funciona a maioria dos cursos de graduação pertencentes a centros das ciências da Saúde e da Educação, como Farmácia e Bioquímica, Ciências Biológicas, Enfermagem, Engenharias, Administração, Pedagogia, Matemática entre outros, e cursos seqüenciais como, Gastronomia, Petróleo e Gás, Gestão Ambiental, etc; E o antigo Poliesportivo, *campus* que recebe o nome do bairro em que está situado, bairro Vila Nova, com 1733m^2 de área construída, onde atualmente funciona um laboratório de análises clínicas, o UniSantoslab, a clínica de fisioterapia e psicologia que atende a comunidade através de agendamentos, e também serve de estágio para os alunos dos cursos respectivos.

Os cursos oferecem aulas práticas, para os alunos exercitarem o aprendizado teórico, nos modernos laboratórios, tanto os da área das ciências e da saúde, como os da área de informática.

Os docentes estão distribuídos pelos centros de ensino: Centro da Saúde, Centro de Ciências da Educação, Centro de Ciências de Exatas e Tecnológicas, Centro de Ciências Jurídicas e Sociais aplicadas e Centro de Comunicação e Artes.

A Unisantos conta ainda com um numeroso corpo discente, distribuído por todos os cinco *campi* que a compõe: *campus* Dom Idílio José Soares, *campus* Vila Nova, *campus* Boqueirão, *campus* Vila Mathias e *campus* Pompéia. Conta também com a colaboração, competência e especialização de mais de mil funcionários, entre cargos administrativos e técnicos, encarregados dos diversos setores de suas unidades.

Existe um serviço terceirizado de limpeza geral. A firma contratada pela universidade é tradicional em nossa cidade. Seus colaboradores estão divididos por todos os setores, fazendo a limpeza interna e externa de cada *campus.* Limpeza esta que é realizada ao longo de todo o dia, no período das 7 às 24 horas. Seus corredores, pátios, salas, salas de aula, banheiros, setores, mobiliários, janelas, bebedouros, etc., são frequentemente limpos, lavados e mantidos com produtos específicos como desinfetantes a base de cloro, limpadores perfumados, detergentes, sabãos, álcool comercial a 70%, e limpadores gerais como os multi-uso, utilizados regularmente para manter a higiene adequada de cada local.

4. 2. Amostragem

Para a definição da amostragem foi realizado um projeto piloto durante o período de abril a julho de 2007 visando à definição dos locais de coleta.

A partir dos dados do estudo piloto foram coletadas amostras de conveniência, levando-se em conta os meses de maio a setembro, na transição sazonal entre o outono e o inverno, com mudanças de temperaturas que variaram entre 20ºC e 33ºC.

Os locais de coleta foram categorizados entre secos e úmidos de acordo com a característica física de cada local. Foram considerados secos, quando a coleta de poeira era realizada em superfície totalmente livre de qualquer tipo de líquido e vestígios de umidade, e foram considerados úmidos, quando no local a superfície pesquisada estava úmida ou molhada com algum tipo de substância líquida, principalmente poças de água. Algumas vezes a coleta foi realizada ao redor de poças de água, próxima de jardins úmidos, e torneiras, e outras vezes a coleta de poeira foi no local molhado, como piso ao redor de valetas com água parada e bebedouros.

Amostras foram coletadas de locais que foram considerados secos, como a rampa da escadaria que dá acesso às salas de aula, que fica alocada internamente ao prédio e não sofrem ação ambiental direta, como ventos e chuvas. De locais que foram considerados úmidos, como a rampa do estacionamento dos funcionários que dá acesso à catraca da guarita de entrada no *campus* Dom Idílio José Soares, durante o período de chuvas, pois, às vezes, acumula água. Esta rampa por sua vez, apesar de estar dentro do prédio da universidade, fica exposta aos fatores climáticos constantemente. De local seco como a entrada principal do *campus* Vila

Nova, que apesar de uma pequena cobertura, também fica exposta a mudanças climáticas, pois na sua continuidade forma-se um corredor descoberto. E de local úmido que dá acesso à piscina do mesmo *campus,* que apesar de ser um local totalmente fechado, na parte interna do prédio, está constantemente úmida devido à temperatura ajustada da piscina, que fica elevada entre 37 e 40ºC, para as práticas dos tratamentos fisioterápicos.

Os pontos de coleta foram distribuídos aleatoriamente, de acordo com a freqüência de transição das pessoas, e separados em quatro grandes locais em cada *campus.* No *campus* Dom Idílio, foram escolhidos estes locais: prédio dos laboratórios; pátio da cantina; áreas de acesso somente aos funcionários; e áreas de acesso aos alunos e funcionários. No *campus* Vila Nova, estes locais: Unisantoslab; áreas comuns do prédio; setor de fisioterapia; setor de psicologia.

4. 2. 1. *Campus* Dom Idílio José Soares

O prédio dos laboratórios não envolve somente os laboratórios onde ocorrem as aulas práticas das diversas disciplinas distribuídas nos diversos cursos, mas compreende todas as áreas comuns do prédio como, escadarias, banheiros, elevador, corredores, passarelas, bem como algumas salas de aula, salas de estudo, salas - laboratórios para realização de pesquisas, como a sala de iniciação científica – e um auditório. Neste prédio, somente o andar térreo, que possui duas áreas de acesso, pode sofrer ação direta das mudanças ambientais, como o vento, que também pode alterar a composição das poeiras dos pisos neste local. Pois, o primeiro andar, que também possui um corredor de acesso ao prédio de salas de aula, como uma passarela, fica constantemente fechado, sem janelas. O segundo

andar é praticamente igual ao primeiro andar, não possui janelas e não possui passarela.

No pátio da cantina estão locais como, xérox, livraria, praça de alimentação, cantina, escadarias e rampa de acesso às salas de aula, orelhões, posto bancário e caixas de atendimento automático, e a capela. Este local possui duas entradas que ficam ao lado do prédio da Reitoria, que podem sofrer ação direta do vento. Em uma delas está uma porta de vidro que permanece aberta durante o dia justamente para arejar o ambiente.

Áreas de acesso somente aos funcionários incluem estacionamento, sala de cartão de ponto digital, elevador e escadaria do prédio da reitoria, porta de entrada do setor de transporte da faculdade, sala dos professores. Estes locais são diversificados entre si. Alguns deles sofrem ação climática direta, como temperatura elevada com a exposição ao sol, ação das chuvas e dos ventos, por não ter uma cobertura, como é o caso do estacionamento, e outros locais que são cobertos, são internos, mas transitam um grande número de funcionários e que consequentemente carregam poeira nos calçados, de um lado a outro.

Áreas de acesso aos alunos e funcionários compreendem todas as outras áreas ainda não mencionadas como, saguão da entrada principal da faculdade, biblioteca, secretaria acadêmica na parte externa, elevador panorâmico, corredores, praças com jardins, etc. A grande maioria destes locais é interno e com cobertura, acontecendo a transição de pessoas da mesma forma que nos outros locais já mencionados, e outros, como os jardins, são locais descobertos, e mais úmidos, principalmente próximo da terra e da vegetação.

Os locais das amostras foram escolhidos de acordo com a exposição e a quantidade de pessoas circulantes durante todos os períodos do dia.

De acordo com o local de coleta foi estabelecido um número de amostras. As amostras foram numeradas em ordem crescente de 01 a 100, para os quatro grandes locais escolhidos.

Na primeira e segunda coleta foram obtidas as amostras de 01 a 20 que estavam distribuídas, randomicamente, pelo prédio dos laboratórios. Estas 20 primeiras amostras foram coletadas de locais como, chão de banheiro, pisos internos próximos às entradas dos laboratórios, escadarias fechadas com pequenas janelas, e piso do elevador.

Na terceira coleta foram coletadas mais dez amostras, de 21 a 30, porém estas foram distribuídas pelas áreas de acesso somente aos funcionários, como a sala onde funciona o cartão de ponto digital que registra a entrada e a saída dos funcionários no período de trabalho, áreas de acesso aos alunos e funcionários, como a praça com jardins que divide os dois prédios, o de sala de aulas e o de laboratórios, e pátio da cantina, envolvendo locais não só do atendimento da própria cantina, mas, locais como piso abaixo dos orelhões e piso dos caixas automáticos do posto bancário.

Na coleta de número quatro, as amostras de número 31 a 40 estavam dispostas entre o pátio da cantina e as áreas de acesso aos alunos e funcionários como, porta da secretaria acadêmica, porta do elevador panorâmico que dá acesso ás salas de aula e á alguns auditórios, porta da biblioteca, catraca da entrada principal do prédio, etc.

Na quinta coleta, as amostras de 41 a 50 estavam entre o prédio dos laboratórios e as áreas de acesso aos alunos e funcionários. Dentre os locais das amostras coletadas estavam pisos descobertos próximos a jardins, piso ao redor de valeta com água parada proveniente da lavagem de materiais utilizados em aula

prática, dentro de um dos laboratórios, e, a superfície de um bebedouro, próximo ao ralo de escoamento da água, onde permanece constantemente úmido.

Já na sexta coleta foram obtidas 30 amostras, compreendidas entre os números 51 e 80, e estas estavam distribuídas dentre os quatro locais já mencionados anteriormente. Foram coletadas de pisos das escadarias, da porta de elevador, e da porta de laboratório, considerados pontos de coletas internos, sem exposição ambiental direta, e, locais que podem sofrer ação ambiental como, catraca do estacionamento, pisos próximos de alguns jardins, corredores externos que ladeiam os prédios e pisos ao redor de valetas de escoamento de água das chuvas.

Na sétima e última coleta deste *campus* foram obtidas as amostras 81 a 100, alocadas entre o pátio da cantina e as áreas de acesso somente aos funcionários. Alguns dos locais podem sofrer ação de ventos, devido a porta de vidro que isola o local das ações ambientais externas, ficar constantemente aberta para arejar o pátio da cantina. Nestes locais estão incluídos: o piso do balcão de atendimento à xerox, o piso onde estão as mesas da cantina, o piso do caixa da cantina e a porta de entrada da capela.

As amostras de poeira foram coletadas e armazenadas em tubos de ensaio, com o auxílio de um *swab* (tipo de cotonete de algodão) esterilizado, descartável e seco. Estes tubos foram devidamente numerados, e alocados em estantes, contendo solução salina para amebas, solução de Page (KROGSTAD, *et al*.1991; DE CARLI, 2001; IREZÁBAL, 2005). Foram transportados em uma bandeja plástica, ao laboratório, para posterior análise.

4.2. 2. *Campus* Vila Nova

O Unisantoslab é um laboratório de análises clínicas da universidade, atende não só a funcionários, professores e alunos, como presta serviço terceirizado para algumas firmas e atende também a população em geral.

Está dividido em setores como: recepção, copa, banheiros, sala de coleta de sangue, sala de triagem dos materiais biológicos, secretaria, sala de administração, sala de faturamento, sala de microbiologia, sala de parasitologia, sala de lavagem e esterilização dos materiais, sala de análises clínicas e todo o seu entorno e acessos.

As áreas comuns do prédio envolvem tanto a entrada principal do *campus*, os corredores laterais, as escadarias, o elevador, os banheiros e o bebedouro principal.

O setor de fisioterapia compreende: recepção, salão principal para atendimento a comunidade, com aparelhos e aparatos específicos para técnicas de fisioterapias, salas de atendimento individualizado, sala dos fisioterapeutas professores e estagiários, sala de reuniões, sala de hidroterapia ortopédica, banheiros e vestiários femininos e masculinos, corredor que dá acesso à piscina, e toda a área que envolve a mesma, e sala de exame médico.

O setor de psicologia está distribuído em dois andares: um deles apresenta uma sala grande de espera, a recepção que atende os agendamentos da comunidade, algumas salas de atendimento, corredor interno, copa e bebedouro, e sala dos psicólogos; no outro andar, um corredor com várias salas de atendimento.

Os locais da amostragem foram escolhidos de acordo com a exposição das pessoas circulantes e que carregam em seus calçados poeiras dos pisos para qualquer local que se desloquem, durante os períodos de atendimento que vai das 7 às 18 horas.

De acordo com o local de coleta foi estabelecido um número de amostras. As amostras foram numeradas em ordem crescente de 01 a 100, como as amostras coletadas no *campus* Dom Idílio José Soares, e foram distribuídas dentre os quatro grandes locais escolhidos.

As coletas foram feitas em dois dias. No primeiro dia foram coletadas as amostras de 01 a 50 que estavam distribuídas, randomicamente, pelo Unisantoslab, algumas áreas comuns do prédio e parte do setor de fisioterapia, como: entrada principal, recepção do laboratório de análises clínicas, box de atendimento ao paciente, salão principal para atendimento aos pacientes, que são locais internos, secos e sem exposição ambiental, e, escadarias e porta do elevador no andar térreo, também locais secos, porém com exposição ao vento. Locais internos, porém úmidos como o piso em baixo do bebedouro, e a sala ortopédica de hidroterapia.

No segundo dia foram coletadas as amostras de 51 a 100, estando estas distribuídas pelo restante do setor de fisioterapia, por todo o setor de psicologia e outras áreas comuns do prédio, como: Entrada principal do *campus*, entrada para a administração do prédio, locais secos podendo sofrer alterações devido ação de ventos e chuvas; porta de acesso á clínica de psicologia, piso interno da recepção da clínica de psicologia, porta da sala da coordenação do setor de psicologia, e sala dos psicólogos, locais secos e internos, protegidos da ação ambiental; corredor de acesso à piscina, vestiários, piso ao redor do bebedouro no setor de psicologia, e o ralo de escoamento da água do mesmo bebedouro, locais úmidos, porém sem exposição ambiental.

As amostras de poeira foram coletadas da mesma maneira que as amostras no *campus* Dom Idílio José Soares: utilizando-se tubos de ensaio, com o auxílio de um *swab* (tipo de cotonete de algodão) esterilizado, descartável e seco. Estes tubos

foram devidamente numerados, e alocados em estantes, contendo solução salina para amebas, solução de Page, sendo transportados em uma bandeja plástica, ao laboratório.

4. 3. Procedimentos

Entre os meses de maio e setembro de 2007, foram feitas 9 coletas de amostras de poeiras de várias áreas de dois *campi* da Universidade Católica da cidade de Santos, o *campus* Dom Idílio José Soares e o *campus* Vila Nova. Foram coletadas 100 amostras de poeira, de forma aleatória, de 4 locais escolhidos do *campus* Dom Idílio José Soares: 35 amostras do prédio dos laboratórios; 22 amostras do pátio da cantina; 17 amostras das áreas de acesso somente aos funcionários; e 26 amostras das áreas de acesso aos alunos e funcionários. E foram coletadas mais 100 amostras de poeira, da mesma forma que no *campus* supra citado, de outros 4 locais escolhidos do *campus* Vila Nova: 23 amostras do Unisantoslab; 18 amostras de áreas comuns no prédio; 35 amostras do setor de fisioterapia; e 24 amostras do setor de psicologia.

Cada amostra de poeira foi coletada com auxílio de um *swab* esterilizado, descartável e seco. Os *swabs* foram colocados em tubos de ensaio contendo solução salina de Page para amebas, foram comprimidos contra a parede interna dos mesmos e em seguida foram descartados. Este mesmo material foi deixado em repouso por até 24 horas em temperatura ambiente, para posterior análise.

Este procedimento utilizado a fim de encontrarmos estruturas típicas de amebas de vida-livre, através de poeiras coletadas e colocadas na solução salina de Page, apresenta incerteza, pois a extração destes organismos não é garantida.

Porém, na tentativa de isolamento destes protozoários, esta solução de Page foi transferida para outro tubo de ensaio contendo nutrientes apropriados para o crescimento e desenvolvimento dos mesmos.

Para o isolamento das amebas foi utilizado ágar não nutriente a 1,5%, preparado com a solução salina de Page (DE CARLI, 2001; IREZÁBAL, 2005), volume de 5ml, e a este agar foi acrescido 50µl de caldo BHI ou solução de Page previamente enriquecida com *E. coli* ATCC 25922, viva, com crescimento de 18 a 24h, preparados em tubos de ensaio de 15cm X 150mm com tampa de aço inox. Foi colocada em cada tubo já identificado com o número das amostras, a solução deixada em repouso (figura 01). Estes foram incubados a uma temperatura em torno de 37ºC durante o período de até 20 dias.

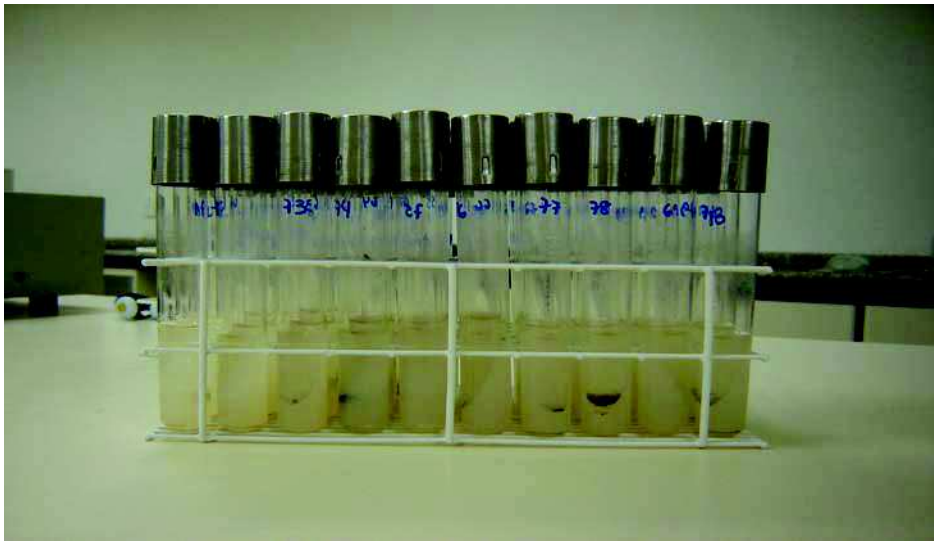


Figura 01 – Material preparado para incubação em estufa bacteriológica.

A verificação do crescimento amebiano e o estudo de suas características foram feitas a cada 2 dias colocando-se 50µl do sedimento, de cada tubo, entre

lâmina e lamínula, e observado com 400X de aumento em um microscópio óptico comum.

As amostras que negativaram após 14 dias de incubação foram descartadas.

As amostras positivas foram subcultivadas para novos tubos contendo 5ml do ágar não nutriente inclinado, também inoculado com a mesma bactéria, onde se acrescentou desta vez, 500µl do sedimento de solução salina contendo crescimento amebiano.

A identificação das amebas foi feita através da observação de formas císticas e trofozoíticas baseadas em critérios morfológicos e pelo movimento típico de cada ameba.

4. 4. Análise laboratorial

A análise foi realizada no laboratório experimental, situado no prédio dos laboratórios, no *campus* Dom Idílio José Soares, da Universidade Católica de Santos.

Para a realização do experimento foram utilizados equipamentos como balança analítica e semi-analítica; agitador magnético com aquecimento; capela de fluxo laminar com lâmpada ultravioleta; autoclave; estufa bacteriológica; refrigerador; e microscópio.

As amostras foram semeadas com a bactéria *E. coli* e manipuladas dentro de uma capela de fluxo laminar, previamente submetida à ação da luz ultravioleta, por um período de 15 minutos, com a finalidade de trabalhá-las num ambiente mais esterilizado.

Para esterilização dos materiais e preparo dos meios de cultura foi utilizada autoclave a 121º C a 1 atm de pressão por 15 minutos. E para descarte de materiais contaminados, como os tubos cultivados e sem crescimento amebiano, foi utilizada autoclave por 30 minutos.

O desenvolvimento e a manutenção do crescimento amebiano foram feitos à temperatura em torno de 37º C em uma estufa bacteriológica.

A solução salina de Page usada para a coleta das poeiras dos pisos, após preparada foi acondicionada à temperatura aproximada de 4º C, em refrigerador, juntamente com os tubos contendo o meio de cultura agar não nutriente.

5. Resultados

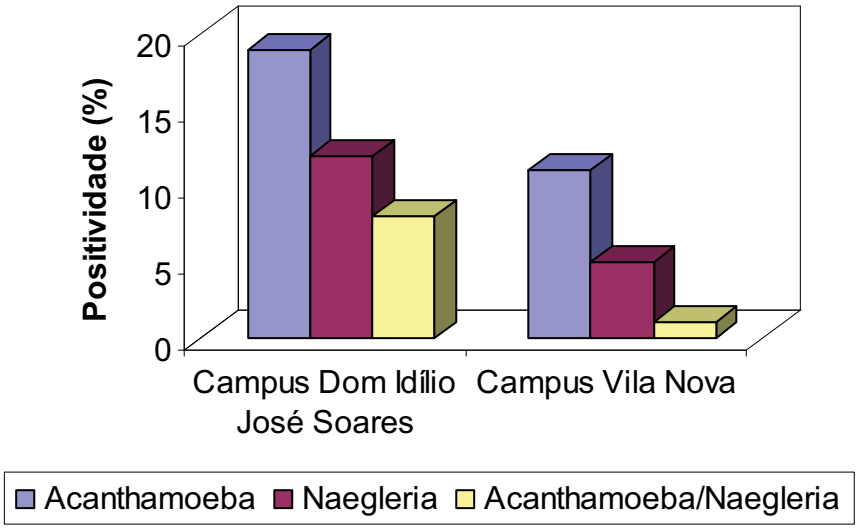
5.1. Análise dos dados

A ocorrência das amebas de vida-livre, observada dentre as 200 amostras coletadas em locais aleatórios da Universidade escolhida, foi expressiva.

Em geral a positividade para as amebas de vida-livre dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*, investigados no *campus* Dom Idílio José Soares (CDI) foi de 39%, e no *campus* Vila Nova (CVN) foi de 17%. Sendo 15% de positividade para o gênero *Acanthamoeba*, 8,5% para o gênero *Naegleria*, e 4,5% para ambos. Totalizando 28% de positividade para estas amebas.

O gráfico 01 demonstra a positividade das amebas de vida-livre, dos dois gêneros escolhidos, encontrada nos dois *campi* estudados.

Gráfico 01: Percentagem das amostras positivas para os gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*, coletadas nos dois *campi* escolhidos da universidade.



No *campus* Dom Idílio José Soares, das 100 amostras analisadas, 39 apresentaram-se positivas através da observação de estruturas císticas e trofozoíticas, caracterizadas pela morfologia e pela forma de locomoção.

Para o gênero *Acanthamoeba* a positividade encontrada foi de 19% (quadro 01) e para o gênero *Naegleria* foi de 12% (quadro 02), sendo que em 8% das amostras (quadro 03) foram encontrados os dois gêneros mencionados.

Quadro 01: Número e percentual de amostras positivas para amebas do gênero *Acanthamoeba,* coletadas em diferentes locais no *campus* Dom Idílio José Soares.

	Gênero *Acanthamoeba*	
	CDI*	
Locais coletados	Nº	% **
Prédio dos laboratórios	4	21
Área de acesso aos alunos e funcionários	4	21
Área de acesso somente aos funcionários	6	31,5
Pátio da cantina	5	26,5
Total	19	100

* *Campus* Dom Idílio José Soares
** os valores percentuais foram aproximados

Quadro 02: Número e percentual de amostras positivas para amebas do gênero *Naegleria*, coletadas em diferentes locais no *campus* Dom Idílio José Soares.

	Gênero *Naegleria*	
	CDI*	
Locais coletados	Nº	%**
Prédio dos laboratórios	2	16,7
Área de acesso aos alunos e funcionários	5	41,6
Área de acesso somente aos funcionários	2	16,7
Pátio da cantina	3	25
Total	12	100

* *Campus* Dom Idílio José Soares
** os valores percentuais foram aproximados

Quadro 03: Número e percentual de amostras positivas para amebas dos dois gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*, encontrados na mesma amostra, em diferentes locais no *campus* Dom Idílio José Soares.

	Gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*	
	CDI*	
Locais coletados	Nº	%
Prédio dos laboratórios	2	25
Área de acesso aos alunos e funcionários	3	37,5
Área de acesso somente aos funcionários	1	12,5
Pátio da cantina	2	25
Total	08	100

* *Campus* Dom Idílio José Soares

A figura 02 ilustra a percentagem geral de positividade dos gêneros escolhidos, encontrada no *campus* supra mencionado.

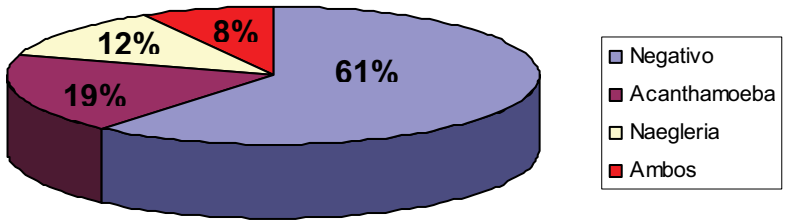


Figura 02 - AVL no *campus* Dom Idílio José Soares

No *campus* Vila Nova, das 100 amostras analisadas, 17 apresentaram-se positivas através da observação de estruturas císticas e trofozoíticas, caracterizadas pela morfologia e pela forma de locomoção.

Para o gênero *Acanthamoeba* a positividade encontrada foi de 11% (quadro 04) e para o gênero *Naegleria* foi de 5% (quadro 05), sendo que em apenas 1% (quadro 06) das amostras foram encontrados os dois gêneros pesquisados.

Quadro 04: Número e percentual de amostras positivas para amebas do gênero *Acanthamoeba,* coletadas em diferentes locais no *campus* Vila Nova.

	Gênero *Acanthamoeba*	
	CVN*	
Locais coletados	Nº	%**
Unisantoslab	2	18
Áreas comuns do prédio	4	36,5
Setor de fisioterapia	4	36,5
Setor de psicologia	1	9
Total	11	100

* *Campus* Vila Nova
** os valores percentuais foram aproximados

Quadro 05: Número e percentual de amostras positivas para amebas do gênero *Naegleria*, coletadas em diferentes locais no *campus* Vila Nova.

	Gênero *Naegleria*	
	CVN*	
Locais coletados	Nº	%
Unisantoslab	0	0
Áreas comuns do prédio	1	20
Setor de fisioterapia	3	60
Setor de psicologia	1	20
Total	05	100

* *Campus* Vila Nova

Quadro 06: Número e percentual de amostras positivas para amebas dos dois gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*, encontrados na mesma amostra, em diferentes locais do *campus* Vila Nova.

	Gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*	
	CVN*	
Locais coletados	Nº	%
Unisantoslab	0	0
Áreas comuns do prédio	1	100
Setor de fisioterapia	0	0
Setor de psicologia	0	0
Total	01	100

* *Campus* Vila Nova

A figura 03 ilustra a percentagem geral de positividade dos gêneros escolhidos, encontrada no *campus* supracitado.

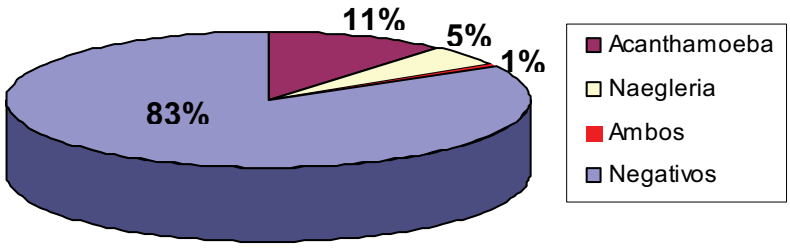


Figura 03 - AVL no *campus* Vila Nova

Analisando-se a ocorrência das amebas de vida-livre dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*, por *campus* estudado, observamos que no *campus* Dom Idílio José Soares a positividade foi bem maior que a do *campus* Vila Nova.

As figuras 04 e 05 representam estruturas císticas e trofozoíticas com características morfológicas para o gênero *Acanthamoeba*, e as figuras 06 e 07 para o gênero *Naegleria.*

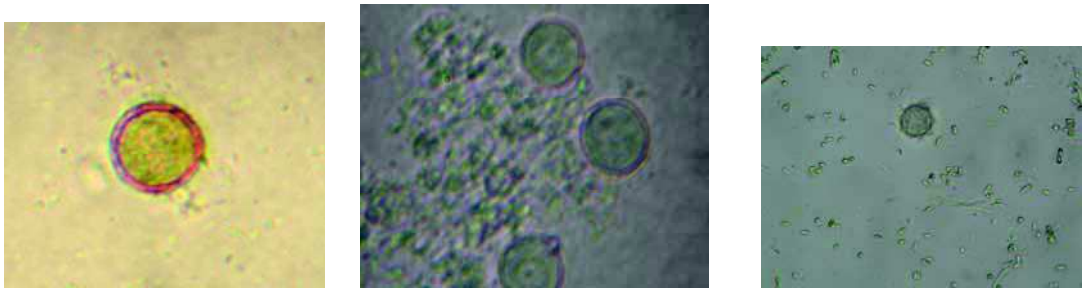


Figura 04 – Morfologia típica de cistos de *Acanthamoeba* spp. (400X).

Figura 05 – Formas trofozoíticas de *Acanthamoeba* spp. (400X).

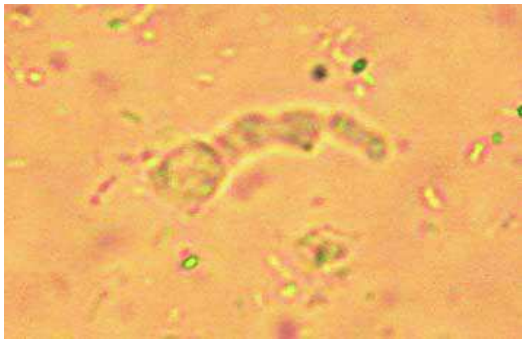


Figura 06 - Trofozoíto característico de *Naegleria* spp. (400X).

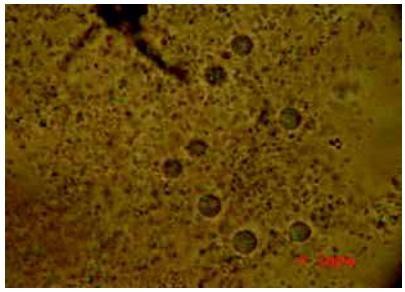


Figura 07 - Cistos de *Naegleria* spp. (400X).

Foram observadas amostras positivas para as amebas dos dois gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria,* tanto em locais considerados secos quanto em locais considerados úmidos (quadro 07).

Quadro 07: Resultado da presença de amebas de vida-livre, nas amostras de poeiras coletadas em cada *campus* pesquisado, e a característica do local.

	Amostras			
	CDI*		CVN**	
	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas
Local Úmido	07	16	07	11
Local Seco	32	45	10	72
Total***	39	61	17	83

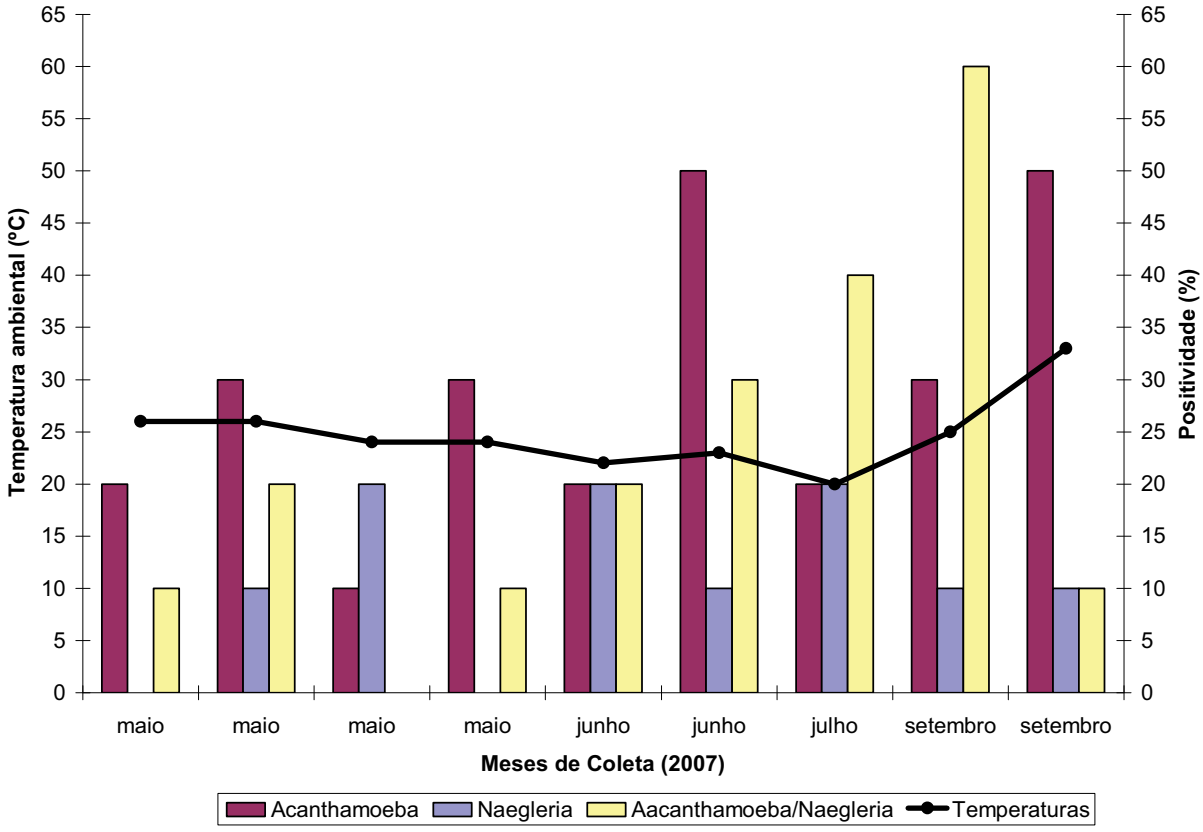
* *Campus* Dom Idílio José Soares
** *Campus* Vila Nova
*** Não houve relação estatisticamente significativa entre as amostras e a localidade.

Não se observou correlação entre as temperaturas ambientais nos dias de coleta, a sazonalidade, nas transições entre outono, inverno e primavera, e a positividade das amostras.

As temperaturas variaram pouco, e em sua grande maioria permaneceram entre 20 e 26º C, sendo que no último dia de coleta a temperatura aproximou-se dos 33º C. Em todas as coletas realizadas foram obtidas positividades para os dois gêneros pesquisados.

O Gráfico 02 demonstra a relação entre a variação da temperatura ambiental, a sazonalidade e a positividade da amostragem.

Gráfico 02: Variação da temperatura ambiental durante os meses de coleta, e a percentagem da ocorrência das amebas de vida-livre dos gêneros escolhidos.



6. Discussão

A idéia central desta pesquisa foi a de realizar um estudo descritivo sobre a ocorrência das amebas de vida-livre (AVL), dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria,* verificando a presença destes protozoários, através da observação de suas estruturas morfológicas características, em ambientes internos, onde circulam pessoas aparentemente saudáveis.

Os resultados apresentados demonstraram a ocorrência de amebas de vida-livre dos gêneros escolhidos nos dois *campi* pesquisados.

Na literatura são raras as pesquisas realizadas sobre a ocorrência das amebas de vida-livre em ambientes internos, então vale ressaltar que esta é uma pesquisa pioneira na cidade de Santos, em ambientes internos e com uma população circulante aparentemente saudável, onde se verificou a presença destas amebas ambientais que possuem interesse médico, e que podem se comportar como parasitas oportunistas e causarem doenças.

A cidade de Santos apresenta o maior índice pluviométrico da Baixada Santista, com chuvas distribuídas durante todo o ano, alcançando média anual de 2.540mm. A presença do Oceano Atlântico e a proximidade da Serra do Mar favorecem o clima litorâneo de transição, quente e úmido, justificando a distribuição das chuvas. As temperaturas apresentam registros extremos com máximas próximas a 40°C e mínimas inferiores a 10°C, sendo a temperatura média anual em torno de 20°C, típica de clima tropical. Outra característica importante da região é a alta umidade relativa do ar, com média anual de 75% (ROCHA, 2007).

O clima da região e a umidade relativa do ar são propícios para a proliferação de muitas espécies de fungos e leveduras e de outros microrganismos, que podem servir de alimento para estes protozoários comensais e ubiquitários, principalmente as amebas do gênero *Acanthamoeba*, que podem ser encontradas em ambientes extremos.

Devido a este fato climático, a metodologia referenciada por diferentes autores (DE CARLI, 2001; SILVA & ROSA, 2003; IREZÁBAL, 2005; CARLESSO, 2007), depois de testada, foi modificada para que os resultados não fossem contaminados por fungos, e ficassem prejudicados.

Meios de cultura utilizados para a incubação e crescimento amebiano, foram colocados em tubos de ensaio, ao invés das placas de Petri, para se reduzir a área de superfície inoculada, melhorar o armazenamento e a incubação da amostra, e se evitar o ressecamento prévio do agar que foi observado quando colocado nas placas, e submetidos a temperatura de aproximadamente 37ºC, pelo período de até 07 dias.

Além disso, para aumentar a positividade e também evitar o ressecamento do agar quando os tubos foram incubados em estufa bacteriológica, a solução de Page usada na coleta das amostras foi transferida para estes tubos, mantendo-os sempre úmidos no período de incubação. Esta técnica assegurou a positividade das amostras até o término do período de 20 dias, de verificação do crescimento amebiano.

Não foi observada, na literatura revisada, relação significativa entre as temperaturas ambientais e a ocorrência das amebas de vida-livre.

Não foi relacionada à presença destas amebas, no ambiente universitário, com as possíveis doenças que podem causar.

Não foi realizado estudo comparativo entre a presença das amebas de vida-livre em ambientes internos com indivíduos aparentemente saudáveis, e nem com indivíduos doentes ou com a imunidade comprometida.

A amostragem não foi distribuída igualmente nos 9 dias de coletas realizadas, portanto não houve relação significativa entre as temperaturas ambientais nos dias de coleta, a sazonalidade, nas transições entre outono, inverno, e primavera, e a positividade das amostras.

A quantidade de amostras coletadas, que foi baseada em outros estudos realizados em ambientes internos, é relativamente pequena para se obter uma análise estatística significativa.

Entre as 200 amostras coletadas das poeiras de diversos recintos da Unisantos, verificou-se uma maior ocorrência de cistos e trofozoítas de *Acanthamoeba* spp., provavelmente por serem, conhecidamente, amebas comensais, ubiquitárias e com grande distribuição ambiental (solo, poeira, água, plantas), e por serem consideradas mais resistentes a ação dos desinfetantes utilizados na limpeza da universidade e a variações ambientais.

Os cistos e trofozoítas de *Naegleria* spp. também foram encontrados, porém com menor freqüência em ambos os *campi*, talvez por estarem associados a locais úmidos e quentes, e as amostras terem sido, em sua grande maioria, coletadas em locais secos. Seus cistos e trofozoítas são pouco resistentes à dessecação e a ação de desinfetantes, fazendo com que apareçam menos em ambientes mais secos ou sujeitos a desinfecções periódicas (CARLESSO, 2007).

Em duas das amostras foi possível observar a forma flagelar do trofozoíta de *Naegleria fowleri*, confirmando-se a espécie, devido somente esta do gênero, apresentar flagelos para locomoção, em uma de suas fases da vida.

Em sua grande maioria, as amostras positivas coletadas nos locais secos foram obtidas em locais de grande circulação de pessoas e grande acúmulo de poeiras, alguns destes locais sofrem ação ambiental direta, por estarem expostos e descobertos, e outros estão protegidos nas imediações internas dos prédios, como: piso da porta do elevador panorâmico, que dá acesso às salas de aula e aos auditórios; piso da rampa e das escadarias que dão acesso aos mesmos locais; pisos das catracas que dão acesso à entrada e a saída da Universidade; piso de baixo dos orelhões; piso dos caixas automáticos do posto bancário; piso da entrada da capela; piso da entrada de cada *campus*; recepção e sala de espera da clínica de fisioterapia que atende diariamente a comunidade.

As amostras positivas coletadas nos locais considerados úmidos, algumas estavam expostas à ação ambiental e, outras, protegidas nos ambientes internos dos *campi.* Porém, foi observado que na sua maioria, estas amostras positivas foram coletadas próxima aos jardins do *campus* Dom Idílio. Esta observação pode estar relacionada não só com a umidade destes ambientes que ajuda a proliferar mais fungos e bactérias, que servem de alimento para as amebas de vida-livre, como pela presença de insetos que podem servir de veículo para estes protozoários. A presença de matéria orgânica, que também serve como fonte de nutrientes, existente nos jardins e em suas proximidades, também pode estar relacionada com a presença destes organismos. E a ação do vento que também é responsável pela formação e circulação de poeiras no ambiente. No *campus* Vila Nova, a maioria das amostras positivas estava relacionada com ambientes muito úmidos e alguns

molhados, como: piso dos chuveiros do vestiário feminino e do chuveiro da piscina; piso de baixo do bebedouro localizado no setor de fisioterapia; ralo de escoamento de água do bebedouro localizado no setor de psicologia;

O encontro de amebas patogênicas no ambiente constitui somente um indicador da possibilidade de aquisição da parasitose. São pouco conhecidos os fatores que condicionam a ocorrência de infecção e doença. Para Page (1976), é evidente que muitas cepas não são patogênicas, ou muitas pessoas não são vulneráveis, ou circunstâncias especiais são necessárias para que ocorram as alterações patogênicas (SILVA & ROSA, 2003).

Apesar dos *campi* serem limpos e lavados diariamente, utilizando-se produtos desinfetantes como o cloro, que provavelmente é administrado na concentração e quantidade adequada e satisfatória, foram encontradas 28% de amostras positivas em sua totalidade. Muñhoz, *et al.* (2003) indicam que determinadas concentrações de cloro administradas em piscinas, não são eficazes contra algumas espécies de amebas de vida-livre, e que existe uma concentração inicial do cloro adequada para matar as formas císticas (mais resistentes) das amebas.

A positividade encontrada para estas amebas pode variar. A distribuição destas amebas não é homogênea, e depende de diversos fatores como: a biologia destes protozoários; o tipo de solos e pisos pesquisados; os tipos de desinfetantes e quantidade utilizada em cada área; a freqüência da limpeza de cada área; o acúmulo de poeiras e de substâncias orgânicas; a circulação de pessoas que carregam poeiras nos calçados.

Os resultados obtidos neste estudo ambiental podem ser comparados com alguns autores que estudaram AVL em ambientes internos hospitalares.

No ano de 2003, Silva & Rosa, com a finalidade de observar a ocorrência de AVL, dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*, coletaram 132 amostras de poeiras em dois hospitais, da cidade de Presidente Prudente (SP), um hospital universitário e um hospital estadual. Obtiveram como percentual de positividade 45,5% para o gênero *Acanthamoeba* e 3,8% para o gênero *Naegleria*.

Carlesso *et a*l., publicaram em 2007, um estudo sobre a presença de AVL em um hospital público da cidade de Porto Alegre (RS). Coletaram 135 amostras de poeiras e biofilmes de 15 diferentes ambientes hospitalares, e obtiveram 35% de positividade, sendo que 34% foram positivas para amebas com aspectos morfológicos do gênero *Acanthamoeba*.

Uma freqüência bem maior do que a nossa, foi constatada por Giazzi (1996), quando estudou a prevalência das AVL em vários locais na cidade de Araraquara (SP), onde coletou um número bem menor, de 23 amostras de poeira, obtendo um percentual de positividade de 86,9% para o gênero *Acanthamoeba*, e 39,1% de positividade para o gênero *Naegleria*.

Os nossos resultados demonstrando uma freqüência relativamente considerável de AVL em ambientes internos, onde circula um grande número de indivíduos aparentemente saudáveis, parece não diferir muito daqueles obtidos em ambientes hospitalares. É possível que a freqüência de AVL ambiental esteja exclusivamente na dependência do número de indivíduos circulantes nesse ambiente e, como conseqüência, o encontro de AVL em ambientes internos, pode ser utilizado para avaliar a saúde ambiental. Somando-se a isso, esses protozoários constituem-se em importantes reservatórios para bactérias potencialmente patogênicas, oferecendo uma boa oportunidade para o biomonitoramento do

ambiente. Na continuação deste trabalho espera-se direcionar esforços para comprovar essa idéia.

7. Referências Bibliográficas

ALVES, J. M.; GUSMÃO, C. X.; TEIXEIRA, M. M.; FREITAS, D.; FORONDA, A. S.; AFFONSO, H. T. *Random amplified polymorphic DNA profiles as a tool for the characterization of Brazilian keratitis isolates of the genus Acanthamoeba.* Braz. J. Med. Biol. Res. 33:19-26, 2000.

AMARAL ZETTLER, L. A.; NERAD, T. A.; O'KELLY, C. J.; PEGLAR, M. T.; GILLEVET, P. M.; SILBERMAN, J. D.; SOGIN, M. L. *A molecular reassessment of the Leptomyxid amoebae*. Protist 151:275-282, 2000.

ARMSTRONG, M. *The pathogenesis of human Acanthamoeba infection.* Infect. Dis. Rev. 2:65-73, 2000.

AVERNER, M.; FULTON, C. *Carbon dioxide: signal for excystment of Naegleria gruberi.* J. Gen. Microbiol. 43:245-255, 1966.

BALAMUTH, W. *Nutritional studies on axenic cultures of Naegleria gruberi*. J. Protozool. 11 (Suppl.): 19-20, 1964.

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

BARKER, J.; BROWN, M. R.; COLLIER, P. J.; FARREL, I.; GILBERT, P. *Relationship between Legionella pneumophila and Acanthamoeba polyphaga: physiological status and susceptibility to chemical inactivation*. Appl. Environ. Microbiol. 58:2420-2425, 1992.

BARKER, J.; HUMPHREY, T. J.; BROWN, M. W. *Survival of Escherichia coli O157 in a soil protozoan. Implications for disease.* FEMS Microbiol. Lett. 173: 291 – 295, 1999.

BERRUETA, T. *Naegleriosis, acanthamoebosis, balamuthiosis*. Dep de Micr Parasit, UNAM, 1 – 7, 2004.

BOOTON, G. C.; LEDEE, D. R.; AWWAD, M. H.; SHARMA, S.; NIZSL, I.; MARKUS, M. M.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. *Acanthamoeba mitochondrial 16S rDNA sequences: inferred phylogeny and support of nuclear ribosomal 18S rDNA gene sequence types*. In S. Billot-Bonef, P. A. Cabanes, F. Marciano-Cabral, P. Pernin, and E. Pringuez (ed.), IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings. John Libbey Eurotext, Paris, France. p. 227-234, 2001.

BOOTON, G. C.; KELLY, D. J.; CHU, Y. W.; SEAL, D. V.; HOUANG, E.; LAM, D. S.; BYERS, T. J.; FUERST, P. A. *18S ribosomal DNA typing and tracking of Acanthamoeba species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of Acanthamoeba keratitis patients in Hong Kong*. J. Clin. Microbiol. 40:1621-1625, 2002.

BOZUE, J. A.; JOHNSON, W. *Interaction of Legionella pneumophila with Acanthamoeba castellanii: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion*. Infect. Immun. 64:668-673, 1996.

BOWERS, B.; KORN, E. D. *The fine structure of Acanthamoeba castellanii. I. The trophozoite*. J. Cell Biol. 39:95-111, 1968.

BOWERS, B.; KORN, E. D. *The fine structure of Acanthamoeba castellanii (Neff strain). II. Encystment*. J. Cell Biol. 41:786-805, 1969.

BOWERS, B. *Comparison of pinocytosis and phagocytosis in Acanthamoeba castellanii*. Exp. Cell Res. 110:409-417, 1977.

BOWERS, B.; OLSZEWSKI, T. E. *Acanthamoeba discriminates internally between digestible and indigestible particles*. J. Cell Biol. 97:317-322, 1983.

BRADLEY, S. G.; Marciano-Cabral, F. *Diversity of free-living "naked' amoeboid organisms*. J. Ind. Microbiol. 17:314-321, 1996.

BRINN, N. T. *Rapid metallic histological staining using the microwave oven*. J. Histotechnol. 6:125-129, 1883.

BROWN, T. J.; CURSONS, R. T. *Pathogenic free-living amebae (PFLA) from frozen swimming areas in Oslo*, Norway. Scand. J. Infect. Dis. 9:237-240, 1977.

BURBIDGE, M.; COAKLEY, W. T.; DE NYEURT, B.; GRIFFITHS, A. J. *At low monovalent cation concentrations k^+ can have a specific effect on the amoebo-flagellate transformation in Naegleria gruberi.* FEMS Microbiol. Lett. 25:271-274, 1984.

BURGER, G.; PLANTE, I.; LONERGAN, K. M.; GRAY, M. W. *The mitochondrial DNA of the amoeboid protozoon, Acanthamoeba castellanii: complete sequence, gene content and genome organization.* J. Mol. Biol. 245:522-537, 1995.

BUTT, C. G. *Primary amoebic meningoencephalitis*. New Engl. J. Med. 274:1473-6, 1966.

BYERS, T. J. *Growth, reproduction, and differentiation in Acanthamoeba*. Int. Rev. Cytol. 61:283-338, 1979.

BYERS, T. J.; AKINS, R. A.; MAYNARD, B. J.; LEFKEN, R. A.; MARTIN, S. M. *Rapid growth of Acanthamoeba in defined media; induction of encystment by glucose-acetate starvation*. J. Protozool. 27:216-219, 1980.

BYERS, T. J.; BOOTON, G. C.; STOTHARD, D. R.; GAST, R. J.; LEDEE, D. R; SCHROEDER, J. M.; AWWAD, M. H.; FUERST, P. A. *Studies of the phylogeny, systematics and pathogenicity of Acanthamoeba using ribosomal and transfer RNA gene sequences*. In S. Billot-Bonef, P. A. Cabanes, F. Marciano-Cabral, P. Pernin, and E. Pringuez (ed.), IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings. John Libbey Eurotext, Paris, France. p. 211-218, 2001.

CAROSI, G.; SCAGLIA, M.; FILICIE, G.; WILLAERT, E. *A comparative electron microscope study of axenically cultivated, trophozoites of free-living amoebae of the genus Acanthamoeba and Naegleria with special reference to the species N. gruberi (Schardinger 1899), N. fowleri (Carter 1970), and N. jadini (Willaert et Le Ray 1973).* Arch. Protistenkd. 273:264-273, 1977.

CARLESSO, A. M; SIMONETTI, A. B.; ARTUSO, G. L.; ROTT, M. B. *Isolation and identification of potentially pathogenic free-living amoebae in samples from environments in a public hospital in the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul*. *Rev Soc Brás Med Trop*, vol.40, n. 3, 2007.

CARTER, R. *Description of a Naegleria spp. isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis and of the experimental pathological changes induced by it*. J Path; 100:217-244, 1970.

CASEMORE, D. P. *Free-living amoebae in home dialysis unit*. Lancet ii:1078, 1977.

CASTELLANI, A. *An amoeba found in cultures of a yeast: preliminary note.* J. Trop. Med. Hyg. 33:160, 1930.

CAVALIER-SMITH, T. *Eukaryotic kingdoms, seven or nine?* BioSystems 14: 461-481, 1981.

CAVALIER-SMITH, T. *The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa*. Inter. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 297-354, 2002.

CAVALIER-SMITH, T. *The excavate protozoan phyla Metamonada Grassé emend. (Anaeromonadea, Parabasalia, Carpediemonas, Eopharyngia) and Loukozoa emend. (Jakobea, Malawimonas: their evolutionary affinities and new higher taxa*. Inter. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 1741-1758, 2003.

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

CERVA, L. *The influence of temperature on the growth of Naegleria fowleri and Naegleria gruberi in axenic culture.* Folia Parasitol. (Prague) 24:221-228, 1977.

CERVA, L. *Acanthamoeba culbertsoni and Naegleria fowleri: occurrence of antibodies in man*. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 33:99-103, 1989.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. *Parasitologia humana e seus Fundamentos Gerais*. 2 ed. São Pauo: Atheneu, p.131 – 138, 2001.

CHANG, S.L. *Small, free-living amebas: cultivation, quantitation, identification, classification, pathogenesis, and resistance*. Curr. Top. Comp. Pathobiol. 1: 201 - 254, 1971.

CHANG, S. L. *Etiological, pathological, epidemiological, and diagnostical considerations of primary amoebic meningoencephalitis.* Crit Rev. Microbiol. 3:135-159, 1974.

CHANG, S. L. *Resistance of pathogenic Naegleria to some common physical and chemical agents*. Appl. Environ. Microbiol. 35:368-375, 1978.

CHIMELLI, L.; HAHM, M. D.; SCARAVILLI, F. *et al*. *Granulomatous amebic meningoencephalitis due to Leptomyxid: report of the first Brazilian case*. Trans R Soc Trop Med Hyg 86:635, 1992.

COSTAS, M.; GRIFFITHS, A. J. *Enzyme composition and the taxonomy of Acanthamoeba*. J. Protozool. 32:604-607, 1985.

CULBERTSON, C. G.; SMITH, J. W.; INNER, J. R. M. *Acanthamoeba: observations on animal pathogenicity*. Science 127:1506, 1958.

CULBERTSON, C. G. *The pathogenicitiy of soil amebas*. Annu Rev Microbiol 50:231– 254, 1971.

CULBERTSON, C. G. *Amebic meningoencephalitis*. Antibiot Chemother 30:28, 1981.

CURSONS, R. T. M.; BROWN T. J.; KEYS, E. A. *Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae: in axenic condiction.* Appl. Environ. Microbiol. 40:62-66, 1980.

DAGGETT, P. M.; LIPSCOMB, D.; SAWYER, T. K.; NERAD, T. A. *A molecular approach to the phylogeny of Acanthamoeba*. Biosystems 18:399-405, 1985.

DAWSON, M. W.; BROWN, T. J.; TILL, D. G. *The effect of Baquacil on pathogenic free-living amoebae.* (PFLA). 1. In axenic conditions. N. Z. J. Mar. Freshwater Res. 17:305-311, 1983.

DE CARLI, G. A. *Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas*. São Paulo: Atheneu. p. 417 – 427, 2001.

DE JONKHEERE, J. F.; VAN DE VOORDE, H. *Differences in destruction of cysts of pathogenic and nonpathogenic Naegleria and Acanthamoeba by chlorine*. Appl. Environ. Microbiol. 31:294-297, 1976.

DE JONKHEERE, J. F.; VAN DE VOORDE, H. *The distribution of Naegleria fowleri in man-made thermal waters*. Am J Trop Med 26:10, 1977.

DE JONKHEERE, J. F. *Ecology of Acanthamoeba*. Rev Infect Dis, 13 (Suppl.5):S385–387,1991.

DYKOVA, I.; LOM, J.; SCHROEDER-DIEDRICH, J. M.; BOOTON, G. C.; BYERS, T. J. *Acanthamoeba strains isolated from organs of freshwater fishes*. J. Parasitol. 85:1106-1113, 1999.

FELDMAN, M. R. *Naegleria fowleri: Fine structural localization of acid phosphatase and heme proteins.* Exp. Parasitol. 41:290-306, 1977.

FERRANTE A. *Free-living amoebae: pathogenicity and immunity*. Parasite Immunol 13:31– 47, 1991.

FORONDA, A. S. *Crescimento de amebas de vida-livre em meios semeados com líquido cefalorraquidiano humano*. Nota prévia. Rev Paul Méd. 87:140, 1976.

FORONDA, A. S. *Observações sobre amebas de vida-livre potencialmente patogênicas*. [Tese de doutoramento] Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979.

FORONDA, A. S.; BAZITO FILHO O.; ROCHA A. A.; BRANCO S. M. *Aspectos ecológicos de amebas de vida-livre em piscinas de São Paulo*. In: Reunião da sociedade Brasileira de Protozoologia, Caxambu, 1985. Resumos: 18, 1985.

FOWLER, M., CARTER, R. F. *Acute pyogenic meningitis probably due to Acanthamoeba sp: a preliminary report*. *Brit. Med. J*. 5464:740-2, 1965.

FULTON, C.; DINGLE, A. D. *Basal bodies but not centrioles, in Naegleria*. J. Cell Biol. 51:826-836, 1971.

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

GELMAN, B. B.; RAUF, S. J.; NADER, R.; POPOV, V.; BORKOWSKI, J.; CHALJUB, G.; NAUTA, H. W.; VISVESVARA, G. S. *Amoebic encephalitis due to Sappinia diploidea.* JAMA 285:2450-2451, 2001.

GIAZZI J. F. *Contribuição para o estudo do isolamento, cultivo e manutenção das amebas de vida-livre* [Tese de livre-docência]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, 1996.

GONZALEZ-ROBLES, A.; FLORES-LANGARICA, A.; OMANA-MOLINA, M.; Shibayama, M. *Acanthamoeba castellanii: ultrastructure of trophozoites using fast freeze-fixation followed by freeze-substitution*. J. Electron Microsc. (Tokyo) 50:423-427, 2001.

GRIFFIN, J. L. *Temperature e tolerance of pathogenic e nonpathogenic free-living amoebas*. Since 178:869-870, 1972.

GRIFFIN, J. L. *Pathogenic free-living amebae*. In J. P. Kreier (ed.), Parasitic protozoa, vol. 5. Academic Press, Inc., New York. 5:507-549, 1978.

GRIFFIN, J. L. *The pathogenic amoeboflagellate Naegleria fowleri: environmental isolations, competitors, ecologic interactions, and the flagellate-empety habitat hypothesis*. J. Protozool. 30:403-409, 1983.

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

IREZÁBAL, J. P.; ISASA, P.; BARRÓN, J.; MARTINEZ, I. *Queratites por Acanthamoeba*. Control Calidad SEIMC, 2005.

JADIN, J. B. *De la dispersion et du cycle dês amibes libres*. Ann Soc. Belge Med. Trop. 54:147 – 61, 1974.

JAHNES, B.; FULLMER, H. M.; LI, C. P. *Free-living amoebae as contaminants in monkey kidney tissue cultures*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96:484-488, 1957.

JANITSCHKE, K.; MARTINEZ, A.; VISVESVARA, G.; SCHUSTER, F. *Animal model Balamuthia mandrillaris CNS infection. Contrast and comparison in immunodeficient and immunocompetent mice: a murine model of granulomatous amebic encephalitis*. J Neuropathol Exp Neurol; 55:815-821, 1996.

JOHN, D. T. *Primary amebic meningoencephalitis and the biology of Naegleria fowleri.* Annu. Rev. Microbiol. 36:101 – 123, 1982.

JOHN, D. T.; COLE JR, T. B.; MARCIANO-CABRAL, F. *Sucker-like structures on the pathogenic amoeba Naegleria fowleri.* Appl. Environ. Microbiol. 47:12 – 14, 1984.

JOHN, D. T.; COLE JR, T. B.; BRUNER, R. A. *Amebostomes of Naegleria fowleri.* J. Protozool. 32:12 – 19, 1985.

JOHN, D. T. *Opportunistically pathogenic free-living amebae*. In J. P. Kreier and J. R. Baker (ed.), Parasitic protozoa, Academic Press, New York, N. Y., 2nd ed., vol. 3, p. 143 – 246, 1993.

KADLEC, V. *The effects of some factors on the growth and morphology of Naegleria* sp *and three strains of the genus Acanthamoeba*. Folia Parasitol. (Prague) 22:317-321, 1975.

KILVINGTON, S.; BEECHING, J. R.; WHITE, D. G. *Differentiation of Acanthamoeba strains from infected corneas and the environment by using restriction endonuclease digestion of whole-cell DNA*. J. Clin. Microbiol. 29:310-314, 1991.

KING, C. A.; WESTWOOD, R.; COOPER, L.; PRESTON, T. M. *Speed of locomotion of the soil amoeba Naegleria gruberi in media of different ionic composition with special reference to interactions with the substratum.* Protoplasma 99:323-334, 1979.

KING, C. A.; COOPER, L.; PRESTON, T. M. *Cell-substrate interactions during amoeboid locomotion of Naegleria gruberi with special reference to alterations in temperature and electrolyte concentration of the medium*. Protoplasma 118:10-18, 1983.

KHUNKITTI, W.; LLOYD, D.; FURR, J. R.; RUSSELL, A. D. *Acanthamoeba castellanii: growth, encystment, excystment and biocide susceptibility*. J. Infect. 36:43-48, 1998.

KINGSTON, D., WARHURST, D. C. *Isolation of amoebae from the air*. J. Med. Microbiol. 2:27-36, 1969.

KONG, H. H.; CHUNG, D. I. *A riboprinting scheme for identification of unknown Acanthamoeba isolates at species level*. Korean J. Parasitol. 40:25-31, 2002.

KONG, H. H.; POLLARD, T. D. *Intracellular localization and dynamics of myosin-II and myosin-IC in live Acanthamoeba by transient transfection of EGFP fusion proteins*. J. Cell Sci. 115:4993-5002, 2002.

KROGSTAD, D. J.; VISVESVARA, G. S.; WALLS, K. W.; SMITH, J. W. *Blood and Tissue Protozoa*, 5 th ed. Manual of clinical microbiology. 68: 744–751, 1991.

KYLE, D. E.; NOBLET, G. P. *Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes*. J. Protozool. 32:99-105, 1985.

LALITHA, M. K.; ANANDI, V.; SRIVASTAVA, A.; THOMAS, K.; CHERIAN, A. M.; CHANDI, S. M. *Isolation of Acanthamoeba culbertsoni from a patient with meningitis*. J. Clin. Microbiol. 21:666-667, 1985.

LATTYAK, M.; CABRAL, G.; MARCIANO-CABRAL, F. *Scanning electron microscopy of trophozoites of Naegleria species*. Proc. Elect. Microsc. Soc. Am. 43:642-643, 1985.

LLOYD, D.; TURNER, N. A.; KHUNKITTI, W.; HANN, A. C.; FURR, J. R.; RUSSEL, A. D. *Encystation in Acanthamoeba castellanii: development of biocide resistance*. J. Eukaryot. Microbiol. 48:11-16, 2001.

MA, P.; VISVESVARA, G. S.; MARTINEZ, A. J. *et al*. *Naegleria and Acanthamoeba infections: reviw*. Rev Infect Dis 12:490-513, 1990.

MADRIGAL SESMA, M. J. *Isolation of free-living amoebae, potentially pathogenic for humans, from 3 species of saurians from the western Canary Islands*. Rev. Sanid. Hig. Publica 62:1405-1409, 1988.

MADRIGAL SESMA, M. J.; ZAPATERO RAMOS, L. M. *Isolation of free-living amoebas from the intestinal contents of reptiles.* J. Parasitol. 75:322-324, 1989.

MARCIAL, M.; ROJAS, M. *Protozoal and helmintic disease*. Kissano Andersons Pathology. Mosby Company St. Louis, 433,1990.

MARCIANO-CABRAL, F.; JOHN, D. T. *Cytopathogenicity of Naegleria fowleri for rat neuroblastoma cell cultures: scanning electron microscopy study*. Infect. Immun. 40:1214 – 1217, 1983.

MARCIANO-CABRAL, F.; FULFORD, D. E. *Cytopathology of pathogenic and nonpathogenic Naegleria species for cultured rat neuroblastoma cells*. Appl. Environ. Microbiol. 51:1133 – 1137, 1986.

MARCIANO-CABRAL, F. *Biology of Naegleria* spp. Microbiol. Rev. 52:114-133, 1988.

MARCIANO-CABRAL, F.; TONEY, D. M. *The interaction of Acanthamoeba* spp. *with activated macrophages and with macrophage cell lines.* J. Eukaryot. Microbiol. 45:452-458, 1998.

MARCIANO-CABRAL, F.; PUFFENBARGER, R.; CABRAL, G. A. *The increasing importance of Acanthamoeba infections.* J. Eukaryot. Microbiol. 47:29-36, 2000.

MARCIANO-CABRAL, F.; BRADLEY, S. G. *Current research on free-living amebae causing granulomatous amebic encephalitis.* J. Eukaryot. Microbiol. 48:3S, 2001.

MARCIANO-CABRAL, F.; FERGUSON, T.; BRADLEY, S. G.; CABRAL, G. *Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), the major psychoactive component of marijuana, exacerbates brain infection by Acanthamoeba*. J. Eukaryot. Microbiol. Suppl:4S-5S, 2001.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp *as agents of disease in humans*. Clin. Microbiol. Rev. 16: 273 – 307, 2003.

MARCIANO-CABRAL, F.; JOHN, D. T. *Acanthamoeba* spp *as agents of disease in humans*. Clin. Microbiol. Rev. 16: 273–307, 2003.

MARTINEZ, A. J. *Free living amebas: natural history, prevention, diagnosis, pathology and treatment of the disease*. Boca Raton: CRC Press, Inc, 156, 1985.

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

MARTINEZ, A. J.; VISVESVARA, G. S. *Free living, amphizoic and opportunistic amebas.* Brain – Phatol 7 (1):583–598, 1997.

MAZUR, T.; HADAS, E.; IWANICKA, I. *The duration of the cyst stage and the viability and virulence of Acanthamoeba isolates*. Trop. Med. Parasitol. 46:106-108, 1995.

MEHLOTRA, R. K.; SHUKLA, O. P. *Pathogenic free-living amoebae: cultivation, nutritional requirements and chemotherapy of infections*. Ind. J, Microbiol. 37:113–123, 1997.

MEISLER, D. M.; RUTHERFORD, I.; BICAN, F. E.; LUDWIG, I. H.; LANGSTON, R. H.; HALL, G. S.; RHINEHART, E.; VISVESVARA, G. S. *Susceptibility of Acanthamoeba to surgical instrument sterilization techniques*. Am. J. Ophthalmol. 99:724-725, 1985.

MERGEYAN, H. *The prevalence of Acanthamoeba in the human environment.* Rev. Infect. Dis. 13(Suppl. 5):S390-S391, 1991.

MICHEL, R.; HAURODER-PHILIPPCZYK, B.; MULLER, K.; WEISHAAR, I. *Acanthamoeba from human nasal mucosa infected with an obligate intracellular parasite*. Eur. J. Protistol. 30:104-110, 1994.

MICHEL, R.; MULLER, K. D.; HOFFMANN, R. *Enlarged Chlamydia-like organisms as spontaneous infection of Acanthamoeba castellanii*. Parasitol. Res. 87:248-251, 2001.

MOURA, H.; SALAZAR, H. C.; FERNANDES, O. *et al*. *Amebas de vida-livre no intestino humano: evidências de parasitismo*. Rev Inst Méd Trop São Paulo, 27:150–156, 1985.

MUNOZ, V.; REYES, H.; TOCHE, P. *et al*. *Isolation of free living amoeba from public swimming pool in Santiago, Chile*. Parasitol. latinoam. [online]. July 2003, vol.58, no.3-4 [cited 13 February 2008], p.106-111. Available from World Wide Web: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-77122003000300003&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0717-7712.

NAPOLITANO, J. J.; LA VERDE, A. V.; GAMBLE, H. R. *Cultivation of Naegleria using alcohol killed bacteria*. Acta Protistol. 16:207-217, 1977.

NEWSOME, A. L.; CURTIS, F. T.; CULBERTSON, C. G.; ALLEN, S. D. *Identification of Acanthamoeba in bronchoalveolar lavage specimens*. Diagn. Cytopathol. 8:231-234, 1992.

O'DELL, W. D.; STEVENS, A. R. *Quantitative growth of Naegleria in axenic culture*. Appl. Microbiol. 25:621-627, 1973.

O'DELL, W. D.; BRENT, M. M. *Nutritional study of three strains of Naegleria gruberi*. J. Protozool. 21:129-133, 1974.

PAGE, F. C. *Re-definition of the genus Acanthamoeba with descriptions of three species*. *J. Protozool*. 14:709-724, 1967.

PAGE, F. C. *A new key to freshwater and soil amoebae*. Cumbria, England, Freshwater Biological Association Scient. Publ 122, 1988.

PASZKO-KOLVA, C.; YAMAMOTO, H.; SHAHAMAT, M.; SAWYER, T. K.; MORRIS, G.; COLWELL, R. R. *Isolation of amoebae and Pseudomonas and Legionella spp. from eyewash stations*. Appl. Environ. Microbiol. 57:163-167, 1991.

PATTERSON, M.; WOODWORTH, T. W.; MARCIANO-CABRAL, F.; BRADLEY, S. G. *Ultrastruture of Naegleria fowleri enflagellation*. J. Bacteriol. 147:217-226, 1981.

PATTERSON, D. J. *The diversity of eukaryotes*. *Am. Nat.* 154:S96-S124, 1999.

PETIT, F. *et al*. *Primary amebic meningoencephalitis: two new cases report from Venezuela*. Arq. Neuro-Psiquiatr. , São Paulo, v. 64, n. 4, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-282X2006000600034&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 14 Fev 2008. doi: 10.1590/S0004-282X2006000600034

PETTIT, D. A.; WILLIAMSON, J.; CABRAL, G. A.; MARCIANO-CABRAL, F. *In vitro destruction of nerve cell cultures by Acanthamoeba spp.: a transmission and scanning electron microscopy study*. J. Parasitol. 82:769-777, 1996.

PRESTON, T. M.; KING, C. A. *Cell-substrate associations during the amoeboid locomotion of Naegleria. J. Gen. Microbiol*. 104:347-351, 1978.

PRESTON, T. M., KING, C. A. *Amoeboid locomotion of Acanthamoeba castellanii with special reference to cell-substratum interactions*. J. Gen. Microbiol. 130:2317-2323, 1984.

POLLARD, T. D.; OSTAP, E. M. *The chemical mechanism of myosin-I: implications for actin-based motility and the evolution of the myosin family of motor proteins*. Cell Struct. Funct. 21:351-356, 1996.

PUSSARD, M.; PONS, R. *Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre Acanthamoeba (Protozoa, Amoebida)*. Protistologica 13:557-610, 1977.

REY, L. *Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 278 – 286, 2001.

RIVERA, F.; MEDINA, F.; RAMIREZ, P.; ALCOCER, J.; VILACLARA, G.; ROBLES, E. *Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients*. *Environ. Res*. 33:428-440, 1984.

RIVERA, F.; ROY-OCOTLA, G.; ROSAS, I.; RAMIREZ, E.; BONILLA, P.; LARES, F. *Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs.* Environ. Res. 42:149-154, 1987.

RIVERA, F.; LARES, F.; GALLEGOS, E.; RAMIREZ, E.; BONILLA, P.; CALDERON, A.; MARTINEZ, J. J.; RODRIGUEZ, S.; ALCOCER, J. *Pathogenic amoebae in natural thermal waters of three resorts of Hidalgo, Mexico*. *Environ. Res*. 50:289-295, 1989.

RIVERA, F., LARES, F.; RAMIREZ, E.; BONILLA, P.; RODRIGUEZ, S.; LABASTIDA, A.; ORTIZ, R.; HERNANDEZ, D. *Pathogenic Acanthamoeba isolated during an atmospheric survey in Mexico City*. Rev. Infect. Dis. 13 (Suppl. 5):S388-S389, 1991.

ROCHA, S. *Análise ambiental do perfil parasitário encontrado no solo arenoso das praias do Município de Santos, S.P.* Dissertação de Mestrado, Programa de Saúde Coletiva, Universidade Católica de Santos, SP, 2007.

RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S. *Ecology of free-living amoebae*. Crit Rev. Microbiol. 20:225-241, 1994.

RODRÍGUEZ, R.; MÉNDEZ, O.; MOLINA, O *et al*. *Infección del sistema nervioso central por amebas de vida libre: comunicación de tres nuevos casos venezolanos*. Rev Neurol, 26:1005-1008, 1998.

RONDANELLI, E. G.; CAROSI, G.; LANZARINI, P.; FILICE, G. *Ultrastructure of Acanthamoeba-Naegleria free-living amoebae*. In E. G. Rondanelli (ed.), Amphizoic amoebae: human pathology. Piccin Nuova Libraria, Padua, Italy, p. 87-125, 1987.

ROWBOTHAM, T. J. *Preliminary report on the pathonicity of Legionella pneumiphila for freshwater and soil amoebae*. J Clin Pathol 33:1179-83, 1980.

ROWBURY, J.; ARMITAGE, J. P.; KING, C. *Movement, taxes and cellular interactions in the response of microrganisms to their natural environment*. In J. H. Slater, R. whittenbury, and J. W. T. Wimpenny (ed.). Microbes in their natural environments. Cambridge University Press, Cambridge. Vol. 34. p. 299-350, 1983.

RUBIN, A. J.; ENGEL, J. P.; SPROUL, O. J. *Desinfection of amoebic cysts in water with free chlorine*. J. Water Pollut. Control Fed. 55:1174-1182, 1983.

SALAZAR, H. C. *et al*. *Isolamento de amebas de vida-livre a partir de água mineral engarrafada*. Rev. Saúde públ., São Paulo, 16:261-7, 1982.

SALAZAR, H. C.; MOURA, H.; RAMOS, R. T. *Isolamento de amebas de vida-livre a partir de água mineral engarrafada.* Rev. Saúde Publ. São Paulo, 16:261–267, 1982.

SALAZAR, H. C.; MOURA, H.; FERNANDES, O.; PERALTA, J. M. *Isolation of Naegleria fowleri from a lake in the city of Rio de Janeiro, Brazil (correspondence)*. Trans R Soc Trop Med Hyg 80:348–349, 1986.

SALLES-GOMES Jr, C. E.; BARBOSA, E. R., NOBREGA, J. P. S. *et al. Meningoencefalite amebiana primária: registro de caso*. Arq Neuro-Psiq (São Paulo), 36:139 – 142, 1978.

SAWYER, T. K.; GRIFFIN, J. L. *A proposed new family. Acanthamoebidae n. fam. (order Amoebida), for certain cyst-forming filose amoebae*. Trans. Am. Microsc. Soc. 94:93-98, 1975.

SCHROEDER, J. M.; BOOTON, G. C.; HAY, J.; NISZL, I. A; SEAL, D. V.; MARKUS, M. B.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. *Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of Acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge*. J. Clin. Microbiol. 39:1903-1911, 2001.

SCHUSTER, F. L. *An electron microscope study of the amoeba-flagellate, Naegleria gruberi (Schardinger). 11. The amoeboid and flagellate stages.* J. Protozool. 10:313-320, 1963.

SCHUSTER, F. L. *An electron microscope study of the amoeba-flagellate, Naegleria gruberi (Schardinger). 11. The cyst stages.* J. Protozool. 10:313-320, 1963.

SCHUSTER, F. L.; SVIHLA, G. *Ribonucleoprotein-containing vesicles in cysts of Naegleria gruberi*. J. Protozool. 15:752-758, 1968.

SCHUSTER, F. L. *Ultrastruture of cysts of Naegleria spp.. A comparative study*. J. Protozool. 22:352-359, 1975.

SCHUSTER, F. L. *Small amebas and ameboflagellates*. In M. Levandowsky and S. H. Hutner (ed.), Biochemistry and physiology of protozoa. Academic Press, New York, N. Y., vol. 1, p. 215 – 285, 1979.

SCHUSTER, F. L. *Comparative effects of selected azole compounds on trophic and cystic stages of Acanthamoeba polyphaga*. *J. Eukaryot. Microbiol*. 40:563-569, 1993.

SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. *Efficacy of novel antimicrobials against clinical isolates of opportunistic amebas.* J. Eukaryot. Microbiol. 45:612-618, 1998.

SCHUSTER, F. L.; DUNNEBACKE, T. H.; VISVESVARA, G. S. *Activity of selected antimicrobials against clinical isolates of pathogenic free-living amebas*. In S. Billot-Bonef, P. A. Cabanes, F. Marciano-Cabral, P. Pernin, and E. Pringuez (ed.), IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings. John Libbey Eurotext, Paris, France. p. 45-48, 2001.

SCHUSTER, F. L. *Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas*. Clin. Microbiol. Rev. 15:342 - 354, 2002.

SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. *Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals*. Journal of Parasitology 34:1001-1027, 2004.

SHIN, L. E.; HADLEY, P. B. *Note on the spontaneous contamination of a bacterial culture by an organism resembling Hartmannella castellanii*. J. Infect. Dis. 58:23-27, 1936.

SILVA, M. A. *Isolamento e identificação de amebas de vida-livre potencialmente patogênicas em amostras de poeira de hospitais da cidade de Presidente Prudente.* Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2001.

SILVA, M. A., ROSA, J. A. *Isolamento de amebas de vida-livre potencialmente patogênicas em poeiras de hospitais*. Rev Saúde públ. 37, 2003.

SINGH, B. N.; DAS, S. R. *Intra-nasal infection of mice with flagellate stage of Naegleria aerobia and its bearing on the epidemiology of human meningo-encephalitis.* Cur. Scien. 41:625-628, 1972.

SINGH, B. N. *Pathogenic and non-pathogenic amebae*. Halsted Press, Division of John wiley & Sons, Inc., New York, 1975.

SINGH, B. N.; DUTTA, G. D. P. *Small free-living aerobic amoebae: soil as a suitable habitat, isolation, culture, classification, pathogenicity, epidemiology and chemotherapy.* Ind. J. Parasitol. 8: 1 -23, 1984.

STEVENS, A. R.; GALLUP, E. D.; WILLAERT, E. *Evaluation of membrane-bound black bodies in trophozoites and cysts of Naegleria spp.*. J. Invert. Pathol. 31:63-76, 1978.

STEVENS, A. R.; DE JONCKHEERE, J.; WILLAERT, E. *Naegleria lovaniensis new species: isolation and identification of six thermophilic strains of a new species found in association with Naegleria fowleri.* Int. J. Parasitol. 10:51-64, 1980.

STEVENS, A.; SHULMAN, S. *Primary amoebic meningoencephalitis: a report of two cases and antibiotic and immunologic studies*. J Infect Dis. 143:193-199, 1981.

STOTHARD, D. R.; SCHROEDER-DIEDRICH, J. M.; AWWAD, M. H.; GAST, R. J.; LEDEE, D. R.; RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S.; DEAN, C. L.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. *The evolutionary history of the genus Acanthamoeba and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types*. J. Eukaryot. Microbiol. 45:45-54, 1998.

SZENASI, Z.; ENDO, T.; YAGITA, K.; NAGY, E. *Isolation, identification and increasing importance of "free-living' amoebae causing human disease*. J. Med. Microbiol. 47:5-16, 1998.

TODD, S. R.; KITCHING, J. A. *Effects of high hydrostatic pressure on morphogenesis in Naegleria gruberi* (Schardinger). J. Protozool. 20:421-424, 1973.

TURNER, N. A.; Harris, J.; Russell, A. D.; Lloyd, D. *Microbial differentiation and changes in susceptibility to antimicrobial agents*. J. Appl. Microbiol. 89:751-759, 2000.

VICKERMAN, K. *Patterns of cellular organization in Limax amoebae*. Exp. Cell Res. 26:497-519, 1962.

VILLEMEZ, C. L.; CARLO, P. L.; RUSSELL, M. A. *Differentiation in Acanthamoeba castellanii is induced by specific monoclonal antibodies*. J. Cell. Biochem. 29:373-379, 1985.

VISVESVARA, G. S.; STHER-GREEN, J. *Epidemiology of free living ameba infection*. J Protozool 37:25S – 33S, 1990.

VISVESVARA, G. S.; Schuster, F. L.; Martinez, A. J. *Balamuthia mandrillaris, n. g., n. sp, agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals.* J. Eukaryot. Microbiol. 40:504-514, 1993.

VISVESVARA, G. S.; NEAFIE, R. C.; MARTINEZ, A. J. *Pathogenic and opportunistic free-living amebae*. In C. R. Horsbrugh, Jr., and A. M. Nelson (ed.), Pathology of emerging infections. American Society for Microbiology, Washington, D. C., p. 257–267, 1997.

VISVESVARA, G. S. *Pathogenic and opportunistic free-living amebae*. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Yolken (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. ASM Press, Washington, D. C., p. 1383-1390, 1999.

VODKIN, M. H.; HOWEW, D. K.; VISVESVARA, G. S.; MCLAUGHLIN, G. L. *Identification of Acanthamoeba at the generic and specific levels using the polymerase chain reaction*. J. Protozool. 39:378-385, 1992.

VOLKONSKY, M. *Hartmanella castellanii Douglas, et classification des hartmannelles.* Arch. Zool. Exp. Gen. 72:317-339, 1931.

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

WALOCHNIK, J.; PICHER, O.; ASPOCK, C.; ULLMANN, M.; SOMMER, R.; ASPOCK, H. *Interactions of "Limax amoebae" and gram-negative bacteries: experimental studies and review of current problems.* Tokai J. Exp. Clin. Med. 23:273-278, 1999.

WALOCHNIK, J.; OBWALLER, A.; ASPOCK, H. *Correlations between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of Acanthamoeba spp.* Appl. Environ. Microbiol. 66:4408-4413, 2000.

WALOCHNIK, J; OBWALLER, A.; ASPOCK, H. *Immunological inter-strain crossreactivity correlated to 18S rDNA sequence types in Acanthamoeba spp*. Int. J. Parasitol. 31:163-167, 2001.

WARHURST D. C.; CARMAN, J. A.; MANN, P. G. *Survival of Naegleria fowleri cysts at 4ºC for eight months with retention of virulence*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74:832, 1980.

WARHURST D. C. *Pathogenic free-living Amoebae.* Parasitology Today, 1:24–28, 1985.

WEIK, R. R.; JONH, D. T. *Agitated mass cultivation of Naegleria fowleri*. J. Parasitol. 63:868-871, 1977.

WILLAERT, E. *Isolament et culture in vitro des amibes du genre Naegleria.* Ann Soc Belge Med Trop 51: 701-8, 1971.

WONG, M. M.; KARR, S. L.; BALAMUTH, W. *Experimental infections with pathogenic amebae in laboratory primate hosts. I. (A) A study on susceptibility to Naegleria fowleri*. J. Parasitol. 61:199-208, 1975.

YANG, S.; VILLEMEZ, C. *Cell surface control of differentiation in Acanthamoeba*. J. Cell. Biochem. 56:592-596, 1994.

8. Anexos

Anexo 1: Preparação do meio de cultivo de Page para amebas de vida-livre.

Solução salina de Page 10X (SP):

Cloreto de sódio (NaCl)	60 mg
Sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$)	2 mg
Fosfato sódico, dibásico (Na_2PO_4H)	71 mg
Fosfato potássico, monobásico (KPO_4H_2)	68 mg
Cloreto de cálcio ($CaCl_2.2\ H_2O$)	2 mg
Agua bidestilada	500 ml

Fonte: IREZÁBAL, 2005.

Anexo 2: Preparação do meio agar não nutriente contendo solução salina de Page para amebas de vida-livre.

Agar não nutriente de Page (Meio de Page):

SP, solução de Page 10X	50 ml
Bacto-Agar, Difco	7,5 g
Água bidestilada	450 ml

Fonte: IREZÁBAL, 2005.