



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**



JAMINNY HELOISE VIEIRA DOS SANTOS RÊGO

AMEBAS DE VIDA LIVRE: UMA REVISÃO

JOÃO PESSOA - PB

2020

JAMINNY HELOISE VIEIRA DOS SANTOS RÊGO

AMEBAS DE VIDA LIVRE: UMA REVISÃO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do Curso
de Graduação em Farmácia, do
Centro de Ciências da Saúde, da
Universidade Federal da Paraíba
como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Thompson Lopes de Oliveira

JOÃO PESSOA - PB

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

R343a Rego, Jaminny Heloise Vieira Dos Santos.
Amebas de Vida Livre: Uma Revisão / Jaminny Heloise
Vieira Dos Santos Rego. - João Pessoa, 2020.
65 f. : il.

Orientação: Thompson Lopes de Oliveira.
Monografia (Graduação) - UFPB/CCS.

1. Acanthamoeba spp. 2. Naegleria fowleri. 3.
Endossimbiontes. I. Oliveira, Thompson Lopes de. II.
Título.

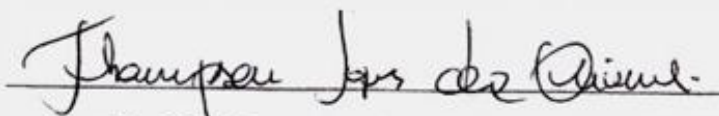
UFPB/BC

JAMINNY HELOISE VIEIRA DOS SANTOS RÊGO

AMEBAS DE VIDA LIVRE: UMA REVISÃO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do
Curso de Graduação em Farmácia,
do Centro de Ciências da Saúde, da
Universidade Federal da Paraíba,
como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia.

Aprovado em 20 de Março de 2020.



Prof. Dr. Thompson Lopes de Oliveira
Universidade Federal da Paraíba- UFPB/CCS/DCF



Drª. Janiere Pereira de Sousa
Universidade Federal da Paraíba – UFPB/CCS/DCF



Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra
Universidade Federal da Paraíba – UFPB/CCS/DCF

À Deus, minha mãe, irmão e a todos
àqueles que estenderam as mãos para
me ajudar a vencer, **DEDICO.**

AGRADECIMENTOS

Gratidão à minha família, em especial minha mãe, meu irmão, meu pai, minhas primas Rafaella, Amanda, Emilly e Quênia, minha tia Sandra e minha avó Severina, por terem investido e acreditado em mim, apesar de todas as adversidades.

Aos meus queridos amigos de estrada, mais especialmente à Rafael, Emilly, Nárgila, Licya, Daiane e Ariadne, por terem trilhado este caminho ao meu lado, me apoiando e incentivando; Vocês tornaram meus dias mais leves e iluminados.

À minha irmã de alma, Tainá, por ter sido a pessoa que me mostrou grande parte do meu potencial, já que desde o dia que entrou na minha vida só me fez crescer e aquecer meu coração com amor e cuidado. Obrigada por ser parte fundamental dos meus dias, por me ajudar a chegar até aqui e por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditei.

À Breno, que segurou na minha mão nos momentos mais difíceis dessa graduação, por ter chorado e rido junto comigo durante esses anos. Sem você, essa vitória não teria sido a mesma.

À Glauber por sempre me ajudar no possível e às vezes até no impossível, me ensinando o que podia e nunca me deixando na mão. Você abriu muitos caminhos e me mostrou que eu não estava sozinha. Gratidão!

Às minhas amigas, Laís, Rosa e Luísa, que sempre foram sinônimos de fortaleza e amor para mim. A felicidade em ter vocês na minha vida é inexplicável, pois sei que estarão sempre comigo, assim como eu estarei sempre com vocês. Obrigada pela irmandade e amor em todos esses anos de amizade.

À Ana Luíza e Cícero, por serem os meus anjos, me confortando e fazendo meus dias mais felizes. Obrigada pelo companheirismo e por sempre dizerem que eu conseguiria chegar até aqui.

À Jessiel, pelos conselhos, pelas alegrias, loucuras, companhia, amor e reciprocidade. Com você, minha caminhada foi mais iluminada e por isso serei sempre grata.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Thompson Lopes de Oliveira, por ter me confiado à realização desse trabalho, e principalmente, por todo o incentivo, apoio, ensinamentos e aprendizagem adquiridos.

E à banca composta pela Dr^a. Janiere Pereira de Sousa e pelo professor Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra por terem gentilmente aceitado o convite para serem os membros avaliadores.

*“O desafio era imenso!
Enfrentei-o de frente,
Sem dar um passo para trás!
Tive medo? Tive.
Mas me orgulho!
Pois continuei de pé, apesar de tudo.”*

José Lucas Moreira

RESUMO

REGO, Jaminny Heloise Vieira dos Santos. AMEBAS DE VIDA LIVRE: UMA REVISÃO. Coordenação do Curso de Farmácia, Trabalho de Conclusão de Curso, CCS/UFPB (2020).

Este trabalho tem como objetivo analisar através de levantamentos de artigos publicados no NBCI (Nacional Center for Biotechnology Information), PubMed, SciELO e Google Acadêmico os aspectos relevantes das amebas de vida-livre (AVL), relação homem-doença no meio ambiente e a importância no âmbito hospitalar. As AVL são responsáveis por infecções do tipo severas como encefalites, onde na maioria dos casos não há uma identificação definitiva quanto ao agente microbiano, ocorrendo em muitos casos apenas após a morte do paciente através de autópsia, bem como infecções moderadas como ceratites, e infecções em pele que acometem o indivíduo com ou sem a necessidade do comprometimento do sistema imunológico. Destacam-se gêneros de importância médica, a *Naegleria fowleri* e *Acanthamoeba spp.* encontradas em rios, lagos e piscinas, que se alimentam de bactérias, fungos e pequenas partículas orgânicas. A exposição e o contágio são permeados por portas de entrada como a mucosa nasal, que com a ocasionalidade de um contato *in natura* e/ou acidental, determina a chegada do agente patogênico ao indivíduo, desencadeando uma série de respostas, visando o controle e/ou a erradicação do promotor da doença. Ressalta-se o alto risco da contaminação em ambientes hospitalares, em especial onde não existe um controle higiênico-sanitário rígido, principalmente nos reservatórios de água, canais de distribuição e limpeza rotineira com uso de substâncias desinfetantes e seguimento dos protocolos estabelecidos em órgãos de vigilância. Atualmente no Brasil, temos uma carência de estudos na área das AVLs, destacando-se um maior número de pesquisas de centros localizados em outros países. Entendemos que com a ampliação dos estudos na área das AVLs, em especial no Brasil, obteremos um melhor conhecimento das doenças relacionadas às AVLs, permitindo a melhor condução dos pacientes acometidos, elucidação dos genótipos circulantes, definição dos mecanismos patogênicos envolvidos nos diferentes processos, que nortearão a terapêutica, os cuidados com os pacientes e as medidas de prevenção.

Palavras-chave: *Acanthamoeba spp.*, *Naegleria fowleri*, endossimbiontes.

ABSTRACT

REGO, Jaminny Heloise Vieira dos Santos. *FREE-LIVING AMOEBAE: A REVIEW*, 2020.

This work aims to analyze through surveys of articles published in NBCI (Nacional Center for Biotechnology Information), PubMed, SciELO and Google Scholar the relevant aspects of free-living amoebae (FLA), human-disease relationship in the environment and the importance in the hospital environment. FLA are responsible for severe infections such as encephalitis, where in most cases there is no definitive identification as to the microbial agent, occurring in many cases only after the patient's death through autopsy, as well as moderate infections such as keratitis, and infections in skin that affect the individual with or without the need for compromised immune system. Noteworthy genera of medical importance, *Naegleria fowleri* and *Acanthamoeba spp.* found in rivers, lakes and pools, which feed on bacteria, fungi and small organic particles. Exposure and contagion are permeated by entrance gates such as the nasal mucosa, which with the occasional natural and/or accidental contact, determines the pathogen's arrival in the individual, triggering a series of responses, aiming at the control and/or the eradication of the disease promoter. The high risk of contamination in hospital environments is emphasized, especially where there is no strict hygienic-sanitary control, especially in water tanks, distribution channels and routine cleaning with the use of disinfectant substances and following the protocols established in surveillance agencies. Currently in Brazil, we have a lack of studies in the area of FLAs, highlighting a greater number of researches from centers located in other countries. We understand that with the expansion of studies in the area of FLAs, especially in Brazil, we will obtain a better knowledge of diseases related to FLAs, allowing better management of affected patients, elucidation of circulating genotypes, definition of pathogenic mechanisms involved in different processes, which will guide therapy, patient care and preventive measures.

Keywords: *Acanthamoeba spp.*, *Naegleria fowleri*, endosymbionts.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Micrografias eletrônicas de transmissão ilustrando a presença de bactérias nos estágios trofozoítos e cistos.....	25
Figura 2 – Micrografia eletrônica de varredura de amebas liberando bactérias no meio ambiente.....	26
Figura 3 – Trofozoíto e cisto de <i>Acanthamoeba spp.</i>	32
Figura 4 – Trofozoíto, forma flagelada e cisto de <i>Naegleria fowleri</i>	35
Figura 5 – Ciclo de vida e mecanismo de patogenicidade simplificado da <i>Naegleria fowleri</i>	36
Figura 6 – “Epitélio sujo” e infiltrado em anel (Ceratite por <i>Acanthamoeba spp.</i>).....	38
Figura 7 – Cascata patogênica da ceratite por <i>Acanthamoeba</i>	39
Figura 8 – Casos de MAP notificados em todo o mundo devido a <i>Naegleria fowleri</i> até 2017.....	42
Figura 9 – Visão geral do procedimento de diagnóstico para ceratite por <i>Acanthamoeba spp.</i>	45
Figura 10 – Os “4Ps” da prevenção em saúde.....	54
Tabela 1 – Métodos diagnósticos – Ceratite	45
Tabela 2 – Drogas clinicamente disponíveis testadas em combinação no estudo de KULSOOM, H., <i>et al.</i> , em 2014 e seu mecanismo de ação conhecido.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVL	Amebas de Vida Livre
CCIH	Comissão de Infecção Hospitalar
CDC	Centro de controle e prevenção de doenças
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAG	Encefalite Amebiana Granulomatosa
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
HCAIS	Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde
HPE	Exame histopatológico
KE	Cariotipagem Eletroforética
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LILACS	Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
MAP	Meningoencefalite Amebiana Primária
MU5AC	Mucina
NCBI	Nacional Center for Biotechnology Information
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHMB	Poli-hexametilenobiguanida
PMN	Polimorfonuclear
RFLP	Comprimento do Fragmento de Restrição de Polimorfismo
SNC	Sistema Nervoso Central
WA	Washington

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3. METODOLOGIA.....	17
4. DESENVOLVIMENTO.....	18
4.1 Resgate histórico: Relação homem x doença.....	18
4.2 Amebas de vida livre: Tempo e descobertas.....	20
4.3 Amebas de vida livre e sua relação de endossimbiose.....	24
4.4 Parasitologia: Ciência e patologias.....	29
4.5 Análise morfológica.....	31
4.5.1 <i>Acanthamoeba spp</i>	31
4.5.2 <i>Naegleria fowleri</i>	34
4.6. Infecções por <i>Acanthamoeba spp</i> .e <i>Naegleria fowleri</i>	36
4.6.1 Ceratite por <i>Acanthamoeba spp</i>	37
4.6.2 Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG).....	40
4.6.3 Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP).....	41
4.7 Métodos diagnósticos.....	44
4.7.1 Ceratite por <i>Acanthamoeba spp</i>	44
4.7.2 Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG).....	46
4.7.3 Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP).....	47
4.8 Tratamento.....	48
4.9 Plano de Justificativa.....	52
5.0 Prevenção.....	55
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
6. REFERÊNCIAS.....	57

1. INTRODUÇÃO

As amebas de vida livre (AVL) são protozoários amplamente distribuídos na natureza, devido a sua capacidade de invadir um hospedeiro e desenvolver parasitismo (SHUSTER; VISVEVARA, 2004). As AVL podem ser encontradas no solo, poeira, ar, ambientes aquáticos tais como rios, lagos, piscinas e água potável podendo também serem encontrados em soluções de lentes de contato (DENDENA et al., 2008; TRABELSI et AL., 2010). Segundo Carlesso (2007), dentro das AVL potencialmente patogênicas, se destacam a *Acanthamoeba spp.* e a *Naegleria fowleri*, as quais tem sido relacionadas com meningoencefalites, infecções na córnea, dentre outras. São essas as espécies, dentre as amebas de vida livre, responsáveis por infecções oportunistas e não oportunistas em seres humanos e em outros animais. (SHUSTER; VISVESVARA, 2004; VISVESVARA; MAGUIRE, 2006).

O gênero *Acanthamoeba*, tem ampla distribuição no solo e na água (VISVEVARA, 2007) estando ela associada à Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG), lesões na pele, infecções renais, infecções pulmonares e da nasofaringe, principalmente em indivíduos imunocomprometidos; além de também poder gerar ceratites naqueles que apresentam micro-fissuras na córnea, entrando elas em contato com a água contaminada. Este parasita já foi isolado de diversos seres vivos e já foi comprovada sua capacidade de sobreviver em diversas condições, sendo elas de temperatura, osmolaridade, pH, cultura de células e temperaturas superiores a 37°C (CALIXTO et al., 2014). Além disto, foi descrito por Greub & Raoult em 2004 que outra característica de grande importância da *Acanthamoeba spp.* é a de carreador de micro-organismos patógenos, como por exemplo bactérias, fungos, vírus ou outros protozoários, levando-se assim, a uma associação nomeada como endossimbiose. No ciclo de vida pode-se observar duas fases: forma proliferativa, que é denominada de trofozoíto (20 µm – 40 µm); ea de resistência definida como cisto (12 – 30 µm) (ALVES, 2006).

Desta forma, a característica de ubiquidade da *Acanthamoeba spp.*, e a presença de um estágio de cisto, sendo este resistente às adversidades do ambiente, bem como ao tratamento e a sua habilidade em resistir o

crescimento de uma variedade de patógenos intracelulares elevam a importância deste microorganismo frente a epidemiologia (FRITSCHÉ et al., 2000).

O gênero *Naegleria* pode ser encontrado amplamente no solo e na água e como citou Movahedi et al. (2012), é o agente etiológico da Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP), acometendo principalmente crianças e adultos jovens saudáveis. A *Naegleria fowleri* possui três fases no ciclo tais como trofozoíto, cisto e a forma flagelada. (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2007; TIEWCHAROEN et al., 2009).

Assim, os gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria* apresentam formas de resistência e conseguem desenvolver parasitismo quando em condições favoráveis, podendo acidentalmente acometer o homem promovendo danos à saúde. A ocorrência destes agentes em um ambiente hospitalar gera um alerta contra esses micro-organismos em virtude do perfil dos usuários dessas unidades de saúde, em especial pacientes imunocomprometidos com uma susceptibilidade ao declínio do seu estado de saúde por esses organismos, principalmente sabendo-se da capacidade endossimbiótica associada a espécies de AVL, bem como idosos e crianças.

Coube então, no seguinte trabalho, citar um dos objetos de estudo que demandam bastante atenção e alerta da sociedade como um todo, que são as amebas de vida livre, fazendo-se um levantamento sobre a sua trajetória por entre os anos, ressaltando seu primeiro contato com o ser humano e como foram iniciadas as pesquisas e estudos, afunilando esta relação até o âmbito hospitalar, em que se dá o foco desta revisão.

O estudo tem como objetivo apresentar uma compilação acerca das amebas de vida livre com maior importância médica, destacando aquelas que utilizam a água como veículo de transmissão para os seres humanos, em especial gênero *Acanthamoeba spp.* e *Naegleri fowleri*, com suas repercussões em ambiente e no *loco* intrahospitalar.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar uma revisão bibliográfica acerca das amebas de vida livre, com ênfase nos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*.

2.2 Objetivos Específicos

Reunir as informações relativas às amebas de vida livre, com respectivos padrões clínicos e epidemiológicos da doença, grau de transmissibilidade e relevância como potencial fonte de infecções ambientais e nosocomiais.

3. METODOLOGIA

Esta revisão narrativa foi conduzida usando recursos de literatura eletrônica que incluem trabalhos de pesquisa originais, além de outras informações obtidas no banco de dados NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information), PubMed, SciELO, LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), Google Acadêmico, editores como Elsevier e outros bancos de dados, através dos descritores que remeteram ao tema: Amebas de vida livre, *Acanthamoeba spp.*, *Naegleria fowleri*, ceratite por *Acanthamoeba*, encefalite amebiana granulomatosa, meningoencefalite amebiana primária, infecções nosocomiais e relações de endossimbiose, entre os períodos de 1950 à 2020.

Com a utilização dos descritores mencionados anteriormente, a busca direcionou a diversos estudos, na forma de artigos, monografias e relatos de casos. Foram aplicados critérios de inclusão e exclusão a partir da leitura dos títulos e resumos, nos idiomas inglês, espanhol e português.

Como critério de inclusão foi levado em consideração características epidemiológicas de estudos clínicos, referência de indivíduos com manifestações clínicas de patologias por *Acanthamoeba spp.* e *Naegleria fowleri*, diagnóstico e tratamento para as referidas doenças e resultados referentes à relação de endossimbiose com outros micro-organismos.

Os critérios de exclusão foram estudos relacionados às outras amebas de vida livre que não se enquadravam nos aspectos clínicos, epidemiológicos e de patogenicidade definidos no estudo.

4. DESENVOLVIMENTO

4.1 Resgate histórico: Relação homem x doença

Para abordar as vertentes da temática deste trabalho, faz-se necessária uma análise das raízes da relação homem-doença através do tempo e suas dimensões ambientais, para destacar como este encontro de antepassados reverbera ainda hoje na sociedade, e da importância desta relação que há tempos corrobora para a determinação do estilo de vida e da inter-relação do homem com os micro-organismos.

De acordo com TOLEDO JÚNIOR (2006), há registros claros de ocorrências epidêmicas que remontam a Aristóteles, 400 anos antes de Cristo. Doenças causadas por agentes patogênicos como vírus, bactérias, protozoários e outros microrganismos assolam a humanidade desde a antiguidade e, diferente do que se imaginava, continuam causando mortes no cenário de hoje.

Para Carvalho e colaboradores (2018), o estudo histórico das doenças possibilita compreender uma sociedade de uma dada época, a partir das redes estabelecidas no âmbito das manifestações socioculturais, pois os processos relativos ao adoecer e à cura são socialmente vivenciados e construídos. Uma doença pode ser analisada a partir da perspectiva de quem adoece, de quem a sofre e de quem a trata, entre outros possíveis olhares.

Carvalho (2009) citou que, a disseminação de um patógeno humano requer a vulnerabilidade da população, que depende além da virulência e da velocidade de transmissão, da imunidade da mesma. Portanto, este aspecto com relação às doenças está relacionado ao estado geral de saúde. A ampliação do conhecimento sobre a transmissão das doenças fez com que a teoria microbiana fosse complementada com os estudos entomológicos e parasitológicos. Isso conduziu a uma esquematização sobre a interação agente-hospedeiro-ambiente, com influência na produção das enfermidades. Compreendendo melhor a saúde como uma resposta adaptativa do homem ao ambiente em desequilíbrio que o circunda, a doença também passa a ser compreendida da mesma forma (SCHIMIDT, 2007).

De acordo com Silva (1997), muitas doenças, e em especial as zoonoses, têm habitats naturais em ecossistemas bem definidos, nos quais patógenos, vetores e hospedeiros naturais formam associações, ou biocenoses, em que o morbígeno circula. A paisagem é, assim, um fator epidemiológico, pois suas características são as do ecossistema, em que a ocupação pelo homem de tais focos naturais leva à ocorrência de casos de doença e, por conseguinte, a enfermidade se incorpora no contexto ecológico, sendo vista como parte integrante do ambiente em que se vive.

Os sucessos obtidos nas primeiras décadas deste século, no controle das doenças infecciosas e parasitárias, através dos programas de imunização em massa, do controle de vetores e do saneamento ambiental pareciam indicar que o conhecimento disponível era suficiente para o manejo das doenças (BARATA, 1997). Porém, no decorrer do tempo, muitas dessas patogenias e vetores acabaram sendo negligenciados, consequentemente colocando a população em posição de vulnerabilidade quanto a todos os riscos que envolvem o contato do homem com os micro-organismos potencialmente patogênicos no meio ambiente, bem como o conhecimento sobre o patógeno, seu habitat e seus mecanismos de patogenia são diretamente proporcionais à intervenção e controle desses aspectos na convivência humana com os mesmos.

Nos últimos anos, tem-se observado a ocorrência de novas doenças, bem como o reaparecimento das tidas como erradicadas (CARVALHO *et. al*, 2009) o que reflete a grande importância dos estudos sobre o comportamento humano em relação ao meio ambiente e seus componentes, sabendo que ambos fazem parte desta rede de associações e estão diretamente interligados à outros seres vivos; Desta forma, consegue-se compreender o convívio dos seres humanos dentro dos diversos habitats, podendo então aplicar o conhecimento sobre a interação homem-patógeno-doença em serviços de controle e desenvolvimento de novos meios para evitar a contaminação com os diversos micro-organismos.

4.2 Amebas de vida livre: Tempo e descobertas

Ao desvendar toda a relação do homem com os micro-organismos, e suas patologias através do tempo, pode-se ressaltar sobre o grande leque de doenças e organismos que ainda precisam ser explorados e sobre aqueles que, acabaram sendo negligenciados por serem raramente encontrados ou por simplesmente não ocasionarem quadros facilmente vistos no campo dos estudos médicos.

Martinez (2019) relata que, durante os 34 anos de 1950 até 1984, marcos significativos foram alcançados; e este período é considerado o mais produtivo na história das amebas de vida livre (AVL). Assim, em 1950 e 1952, fez-se um trabalho fundamental que formou a base da classificação taxonômica moderna das AVL de acordo com padrões de divisão nuclear. Em 1958 em um laboratório de pesquisas em Indianápolis, culturas de tecidos estavam sendo utilizados para testes de segurança da vacina contra poliomielite.

Como parte do teste, ratos e macacos foram inoculados intravenosa, intracerebral e até mesmo intranasal. Inesperadamente, todos os animais utilizados faleceram e estudos histopatológicos dos tecidos e culturas revelaram que houve crescimento amebiano e o aparecimento de placas nas culturas que a princípio tinha-se pensado que eram de origem viral. A ameba era da espécie *Acanthamoeba*, aparentemente advinda de uma contaminação pelo ar.

Amebas de vida livre (AVL), também chamadas límax ou anfizóicas, são protozoários amplamente dispersos na natureza e seu envolvimento em patologia humana só foi reconhecido a partir de 1965, quando casos fatais de meningoencefalite foram descritos na Austrália.

Primeiramente o microorganismo foi identificado como *Acanthamoeba* e posteriormente esse agente etiológico foi classificado como *Naegleria fowleri*, por Fowler e Carter (CARTER, 1968). Em seguida a ameba foi detectada em humanos, em um paciente com AIDS, sendo classificada como pertencente à ordem *Leptomyxida* (ANZILET *et al.*, 1991). Em 1993, Visvesvara e colaboradores identificaram a ameba da ordem *Leptomyxida* como *B. mandrillaris*. Foram descritos pouco mais de 100 casos de encefalite por *B. mandrillaris* no mundo (SCHUSTER & VISVEVARA, 2004b).

Após os anos 2000, Dunnebacke e colaboradores (2004), isolaram a *B. mandrillaris* pela primeira vez do meio ambiente. Gelman e colaboradores (2001) relataram o único caso ocorrido até hoje de encefalite causada pela ameba do solo *Sappinia diploidea*, em um homem imunocompetente. O relato sugere que a porta de entrada foi o trato respiratório, pois o paciente tinha contato com animais de fazenda e talvez à exposição aos cistos da ameba carregados pelo ar tenham penetrado através das narinas.

Devido à recuperação do paciente, é provável que esta ameba seja menos virulenta do que às três principais AVL potencialmente patogênicas. Entretanto, com o aumento de pessoas imunocomprometidas e debilitadas, existe a possibilidade dessa ameba começar a ser reconhecida como agente oportunista em diversas infecções (SCHUSTER & VISVEVARA, 2004b; SCHUSTER, 2002; GELMAN ET AL., 2001).

A partir dos isolamentos feitos por Salazar (1978), foram encontradas amostras positivas para os gêneros *Naegleria* e *Acanthamoeba* em coletas variadas de água, no Rio de Janeiro. Moura em 1980 isolou a partir de piscinas de clubes do Rio de Janeiro, diversos gêneros de AVL com algumas amostras apresentando ação patogênica para camundongos. Ainda em 1980, Ramos comprovou a presença de amebas de vida livre em amostras de uma marca de água mineral muito vendida, também na cidade do Rio de Janeiro.

Após os estudos descritos acima, a atenção dos pesquisadores e conhecedores da área voltou-se para este assunto, levando ao desenvolvimento de diversas pesquisas para isolamento e identificação das amebas de vida livre, mesmo que ainda seja uma abordagem escassa e um meio que demanda uma maior imersão para que se entendam todos os mecanismos de patogenicidade e interação fisiológica com o homem.

Por todo mundo, trabalhos foram desenvolvidos baseados na interação entre o homem e as AVL, corroborando para disseminação do conhecimento sobre as possíveis doenças que esses micro-organismos podem desenvolver, como citado num artigo baseado em um relato de caso no ano de 2015 por Cope e colaboradores, sobre dois casos, um fatal e um sobrevivente, de Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP) causado pelo gênero *Naegleria* sp. Os casos ocorreram em 2013 na Flórida (EUA) e no Texas (EUA), e ambos os pacientes foram acometidos de forma acidental pela AVL. Em 2016, um

caso de infecção cutânea amebiana rara foi relatado por Chang e colaboradores em Seattle, WA que serviu de alerta para essas infecções que, por mais raras que sejam, merecem atenção por levarem potencialmente à óbito. Outro relato com a ocorrência de ceratite amebiana, foi o foco de uma publicação desenvolvida em 2018 por Mafrand *et al.* na cidade de Córdoba, em que há o registro de 11 casos da doença associados ao uso de lentes de contato e cirurgia refrativa, e um dos casos foi por infecção em seu trabalho durante o uso de uma cisterna.

Ao serem isoladas e identificadas em ambientes hospitalares, pode-se considerar um risco de contaminação iminente para o ser humano, até mesmo por serem locais em que transitam pessoas mais susceptíveis à contaminação acidental e até mesmo comensal, e este alerta despertou o levantamento de coletas para a identificação morfológica e testes de potencial patogênico para quantificar o nível de exposição às amebas com a habilidade de sobreviver a condições favoráveis ao desenvolvimento das doenças por eles causadas no organismo humano.

Em território brasileiro, pesquisadores levantaram esforços para conseguir entender um pouco mais sobre esses micro-organismos e iniciaram coletas no interior de alas hospitalares para o possível isolamento das AVL, como o estudo feito por Crozetta em 2007, em que foram encontradas amostras positivas para AVL no Hospital de Clínicas de Curitiba a partir de técnicas morfológicas e de biologia molecular.

Em 2011, Zanella em sua pós-graduação, conseguiu isolar amostras do gênero *Acanthamoeba* em ambientes secos e úmidos, em que 77,4% dos isolados foram classificados dentro do grupo II, que engloba a maioria das espécies patogênicas, tendo ainda sido encontradas tolerância à temperatura e pH, assim como resistência a desinfetantes, que caracterizam um grande potencial de sobrevivência e proliferação do gênero em ambientes fechados, o que aumenta consideravelmente o risco de contaminação humana.

No Rio Grande do Sul, um estudo desenvolvido por Alves em 2016, após testes de termotolerância, indicou que 60% das amostras cresceram em diversas temperaturas, sendo 18% delas consideradas altamente patogênicas, e após testes de osmotolerância, houve o crescimento de 44% na concentração em que geralmente haveria a lise do microorganismo; todas as

coletas deste estudo realizadas de amostras de poeira de ar condicionado em Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica de um hospital escola.

Por serem patógenos com uma sensibilidade particular, tanto para determinadas temperaturas quanto para diferentes osmolaridades, para se medir o potencial patogênico de cada espécie, os testes requeridos são os de termotolerância e osmotolerância. Segundo Carlesso (2006), para o teste de termotolerância, as temperaturas variam entre 25°C, 37°C e 45°C, fazendo-se em triplicata para a temperatura de 37°C já que é neste ponto em que a ameba passa para a sua forma de trofozoíto e se torna potencialmente nociva ao organismo humano.

Acanthamoeba spp. é tolerante a uma ampla gama de osmolaridade, permitindo-lhe sobreviver em água destilada, meios de cultura de tecidos, fluidos corporais de mamíferos e água do mar (MARTINEZ, 1985; MARTINEZ & VISVEVARA, 1997; SCHUSTER & VISVEVARA, 2004; VISVEVARA & MAGUIRE, 2006). A *Naegleria*, por outro lado, nunca foi isolada de água do mar, como resultado de uma elevada sensibilidade a elevados níveis de osmolaridade (VISVEVARA, 2007).

Tendo em vista todas essas pontuações feitas por diversos autores quanto à osmotolerância desses gêneros de amebas de vida livre, o teste de osmolaridade consiste na inoculação de trofozoítos em meio de cultura Agar não nutriente acrescido de manitol em diversas molaridades (0,5 M, 1,0 M e 1,5 M encubadas a 37°C por 24h para a formação de colônias). Experimento feito em triplicata.

4.3 Amebas de vida livre e sua relação de endossimbiose

A interação das amebas com outros micro-organismos em seu ambiente é múltipla. Como fonte de alimento, as bactérias são uma importante fonte de alimento para as amebas de vida livre. No entanto, algumas bactérias estabeleceram uma relação simbiótica estável com amebas, onde as mesmas podem servir como reservatórios para manter e dispersar bactérias patogênicas no ambiente ou como vetores de doenças bacterianas em humano (MARCIANO-CABRAL, 2004).

Ainda sobre as citações de Marciano-Cabral (2004), os estudos de Rowbotham (1980, 1983, 1986) começaram uma nova era de investigação sobre a interação de bactérias patogênicas e amebas vivas como reservatórios de patógenos humanos, destacando que não houve apenas a demonstração da proliferação intracelular de *Legionella pneumophila* em amebas de vida livre, mas também ressaltou a forma de contágio com essa bactéria, que se dá pela inalação de gotículas de água ou por amebas previamente cheias com esses micro-organismos. Essa associação, em muitos casos, é necessária para que haja a sobrevivência dessas espécies.

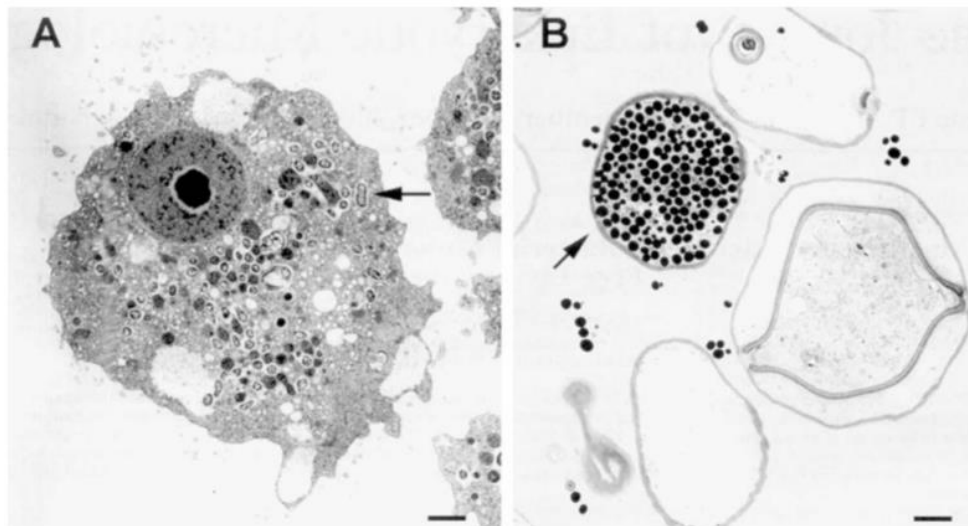
Apesar da sua atividade fagocitária, as amebas não podem degradar todos os micro-organismos. Alguns resistem à digestão e outros até usam as amebas como hospedeiros para a sua própria replicação (THEWES e colaboradores, 2019) assim como uma grande variedade de bactérias, que têm estratégias desenvolvidas para resistir à fagocitose, sobreviver e explorar para multiplicação e, portanto, são definidos como endossimbiontes.

Essas bactérias geralmente são capazes de sobreviver ao encistamento da ameba, e o estilo de vida intracelular protege-as de condições ambientais adversas. Essa adaptação faz da ameba um veículo potencial de virulência para bactérias patogênicas (LOVIENO, 2010). Dessa forma, as amebas já são modelos bem estabelecidos para o estudo da interação com bactérias (THEWES e colaboradores, 2019).

Segundo Balczun e Scheid (2017), a análise das interações de AVL e espécies de bactérias patogênicas, ou outros micro-organismos, é de grande valor para a saúde pública, principalmente levando-se em consideração que bactérias incorporadas nos trofozoítos mostram maior resistência aos biocidas,

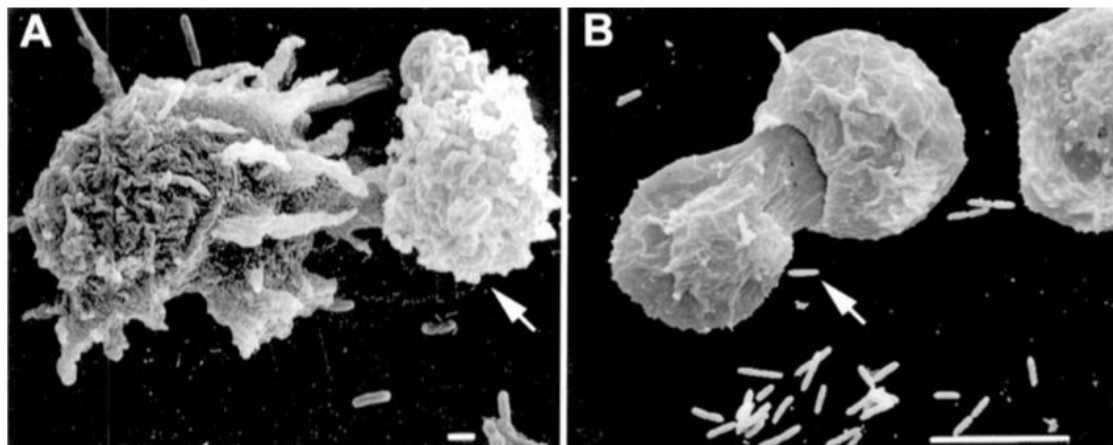
conferindo assim uma maior resistência das bactérias dentro dos cistos. A associação de amebas de vida livre e bactérias patogênicas está se tornando mais amplamente reconhecida por serem bactérias, fungos ou vírus isolados de humanos em ambientes diversos, incluindo sistemas de água em hospitais (MARCIANO-CABRALET *et al.* 2003; MICHEL, BURGHARDT e BERGMANN 1995; WALOCHNIK *et al.* 1998) o que revela um potencial risco de exposição e possível contaminação com esses organismos potencialmente patogênicos, sendo eles a própria ameba ou o que ela pode possivelmente carrear em seu interior.

Figura 1: Micrografias eletrônicas de transmissão ilustrando a presença de bactérias nos estágios trofozoítos e cistos. (A) Trofozoíto de um isolado clínico de *Acanthamoeba* (T4) que abriga naturalmente alfa-Proteobactérias (seta). (B) Um cisto de *Acanthamoeba* contendo *Staphylococcus aureus* (seta). As barras de escala representam 1 µm.



Fonte: Adaptado de MARCIANO-CABRAL, 2004

Figura 2. Micrografia eletrônica de varredura de amebas liberando bactérias no meio ambiente. (A) *Acanthamoeba* libera bactérias intracelulares (*Legionella*) pela formação e liberação de vesículas cheias de bactérias (seta). A barra de escala representa 1 μm . (B) As bactérias presentes nos cistos amebianos são liberadas durante o desencistamento da ameba (seta). A barra de escala representa 10 μm .



Fonte: Adaptado de MARCIANO-CABRAL, 2004

Os vírus são componentes altamente abundantes e onipresentes da biosfera. Seus genomas são extremamente variáveis em relação à sua composição, organização e tamanho. Assim, os vírus representam organismos simples e especializados que interagem em seu ambiente intracelular com potenciais hospedeiros e micro-organismos. A relação dos vírus em estreita associação com as AVL começou em 1974, quando Schuster e Dunnebacke detectaram partículas semelhantes a vírus no interior da *Naegleria sp.* Apenas alguns exemplos de interação entre AVL e protozoários (e também fungos) foram analisados até o momento, incluindo exemplos de endozoocoria ou parasitismo.

Como forma de exemplo, o *Cryptosporidium parvum* que causa a criptosporidiose, uma doença parasitária do trato intestinal de mamíferos, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, incluindo pacientes com HIV/AIDS, que frequentemente sofrem de complicações intratáveis, que podem ser fatais. Em experimentos de co-cultivo, a capacidade da *Acanthamoeba* de predação oocistos de *Cryptosporidium* foi demonstrada por (BALKZUN & SCHEID, 2017).

As amebas desempenham um papel na potencial virulência e ecologia das bactérias intracelulares, atuando como vetor e reserva, influenciando a

dinâmica e a diversidade da população (GARCIA, 2013). Ao explicar sobre o assunto, Cateau *et al.* (2014), citou a formação dos biofilmes, que são de grande importância no crescimento e sobrevivência de micro-organismos em ambientes naturais e artificiais, onde tanto a estrutura como a composição são fatores que podem ser influenciadores na predação bacteriana pelos protozoários e que, após a ingestão, tanto pode ocorrer a digestão dessas bactérias e a utilização dos nutrientes ou a fagocitose com a sobrevivência do microorganismo e até a sua multiplicação com ou sem a *lise* do protozoário. Desta forma, a disseminação da ameba contaminada pode ocorrer e os patógenos podem colonizar outros ambientes.

As infecções associadas aos cuidados de saúde (HCAIs) são algumas vezes associados à água contaminada. Infecções transmitidas pela água associadas a patógenos oportunistas tem sido reconhecidas como uma causa frequente de infecções adquiridas na área da saúde (FREIJE, 2005). Embora o hospital seja repleto de fontes de contaminação, talvez uma das mais negligenciadas, fonte importante e controlável de patógenos comuns é água do hospital. A principal causa da diminuição da qualidade da água é o acúmulo de biofilme e corrosão das linhas de distribuição e superfícies do tanque resultantes de projetos inadequados ou envelhecimento de sistemas de distribuição e estagnação da água (ANAISSIE, 2002).

Diferentes tipos de água podem ser distinguidos nos hospitais: (i) água potável para alimentos ou cuidados de saúde para pacientes imunocomprometidos; (ii) água tratada, como água para hidroterapia em piscinas e hemodiálise; (iii) água estéril para injeção, alimentos, e beber para pacientes imunocomprometidos; e (iv) água de qualidade para lavanderia etc. Sistemas de distribuição de água e equipamentos ou serviços que utilizam a utilizam, podem servir como reservatórios para patógenos oportunistas transmitidos pela água nos centros de saúde (CATEAU, 2014).

Algumas AVL também permitem a sobrevivência e o crescimento de patógenos bacterianos ligados a infecções nosocomiais como *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (MUCHESA, 2015). Um ponto chave dos estudos realizados foi conhecer como as AVL acabam protegendo seus colonizadores até mesmo dos tratamentos usuais de desinfecção de água, principalmente quando

detectados dentro de cistos que formam uma barreira física contra esses métodos de desinfecção (CATEAU, 2014). Essas amebas, especialmente aquelas com maior potencial patogênico, pode tolerar extremos de pH, osmolaridade e temperatura (KHAN, 2009), o que dificulta ainda mais os meios de controle.

Alves, em 2006, ao avaliar a presença de AVL em piscinas e no solo de jardins que as rodeava, encontrou 13 (39,33%) amostras positivas isoladas de piscinas, destas 83,3% pertencentes ao gênero *Naegleria*, 16,6% ao gênero *Acanthamoeba* e 16,6% para o gênero *Vannella*. Já, Zanella, em 2011, apresentou que das 66 amostras de água e materiais dos biofilmes coletados dos ambientes selecionados em um hospital no Rio Grande do Sul, 19 (29%) mostraram-se positivas para a presença dos protozoários, tendo sido obtidas AVL em todos os ambientes estudados, principalmente do gênero *Acanthamoeba spp.*

Um estudo feito em fontes termais terapêuticas no noroeste do Irã, em 2012 por Solgi e colaboradores, comprovou a presença de amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba spp.* em 12 (20%) das 60 amostras de água e sedimentos e um grande crescimento foi observado à 37°C e em 8 amostras, houve crescimento à 42°C. Ainda neste estudo, uma amostra positiva foi detectada aos 70°C, comprovando assim o potencial de termotolerância que as amebas podem apresentar.

Alves, em 2012, desenvolveu um estudo de determinação experimental do potencial patogênico após isolamento e caracterização molecular da *Acanthamoeba spp.* e como resultado do experimento de termotolerância, houve crescimento tanto à 25°C como à 37°C, e entre os 19 isolados submetidos ao experimento de osmotolerância, 7 (37%) apresentaram crescimento numa osmolaridade mais baixa (manitol 0,5 M), 7 (37%) em presença de manitol 1,0 M e 8 (42%) em alta osmolaridade (manitol 1,5 M), dito isto, AVL como *Acanthamoeba spp.* são muito tolerantes a altas temperaturas e osmolaridades e, portanto, podem representar um grande risco à saúde em termos de qualidade da água (Calvo 2013), o que indica um potencial patogênico alto para esses protozoários, que conseguem sobreviver em condições extremas, facilitando assim sua disseminação nos diversos veículos,

principalmente a água, podendo levar consigo essa diversidade de seres microscópicos como bactérias, fungos, vírus e outros protozoários.

É através de todos esses relatos, que justifica-se a realização do presente trabalho com respectivos enfoques, apresentando uma compilação acerca das amebas de vida livre um pouco sobre as formas de identificação daquelas com maior importância médica, porém com um destaque naquelas que usam a água como veículo de transmissão para os seres humanos e animais, sendo elas do gênero *Acanthamoeba spp.* e *Naegleria fowleri*, e de sua importância como patógenos raros mas potencialmente perigosos à saúde humana, principalmente daqueles que estão em dependências hospitalares.

4.4 Parasitologia: Ciência e patologias

Segundo Cox (2002), o campo da parasitologia humana é bastante vasto, e tantas e abrangentes descobertas foram feitas, que não é possível fazer justiça a todo o assunto. Portanto; apenas os aspectos mais significativos e os parasitas mais importantes são considerados em duas categorias principais, os helmintos e os protozoários. Devido ao seu pequeno tamanho, não foi possível reconhecer nenhum protozoário até a invenção do microscópio e seu uso por Antonie van Leeuwenhoek no final do século XVII. O estudo dos protozoários parasitários só começou realmente dois séculos depois, após a descoberta de bactérias e a promulgação da teoria dos germes por Pasteur e seus colegas no final do século XIX.

Foi apontado acima que os seres humanos abrigam várias espécies de amebas. As mais comuns são *E. histolytica*, que acaba de ser considerada, e uma espécie inofensiva maior e superficialmente semelhante, *E. coli*; A própria ameba, *E. histolytica*, foi descoberta por Friedrich Loesch (também conhecido como Fedor Lesh) em 1873 na Rússia, e Loesch também estabeleceu a relação entre o parasita e a doença em cães experimentalmente infectados com amebas de humanos.

No Brasil, o histórico da parasitologia margeia o caminhar da medicina tropical, quando em 1829, foi criada a Sociedade de Medicina e Cirurgia do Rio de Janeiro que, através de um amplo programa, se estendeu desde a adoção de medidas de higiene pela população até a medicina legal. Por volta de 1860,

os fundamentos da ciência chamada de parasitologia foram estabelecidos e os parasitas se tornaram então os responsáveis por importantes doenças do homem e dos seus animais domésticos (MASCARINI, 2003).

A história subsequente da parasitologia humana gira em torno de descrições precoces de uma doença específica e da identificação do parasita causador da doença, não necessariamente no transtorno; a elaboração do ciclo de vida; e, finalmente, o estabelecimento da relação causal entre o parasita e a doença. A parasitologia, entendida como a ciência que estuda o parasitismo ou a inter-relação entre parasita e hospedeiro, é uma ciência relativamente moderna. Durante séculos, os parasitas foram estudados isoladamente de uma perspectiva zoológica.

Foi no século 19 que a parasitologia experimental nasceu com o conhecimento de alguns ciclos biológicos de parasitas; mas foi no século 20 que a parasitologia passou por um grande avanço com conquistas como a cultura *in vitro* de parasitas, a incorporação de técnicas imunológicas ou o uso do microscópio eletrônico, permitindo um conhecimento detalhado dos protozoários parasitas (COX, 2002).

Durante muito tempo, as doenças parasitárias têm sido associadas a países tropicais onde as condições higiênicas e sanitárias são deficientes. No entanto, nada mais longe da realidade. Nas últimas décadas, os países desenvolvidos testemunharam uma emergência de determinadas parasitoses devido a diversas causas: migrações, turismo, importação de costumes alimentares, internacionalização do comércio, etc. Estima-se que 20% da população do mundo tenha pelo menos um parasita (GARRIDO-CARDENAS 2017).

Várias infecções parasitárias aumentaram substancialmente desde 1990 (HOTEZ, 2018). Como um grande fator a falta de conhecimento e de buscas para entender melhor sobre os mecanismos de patogenicidade e de como evitar o contágio com os parasitas determinaram um espectro em nosso ambiente das formas saprofíticas, que negligenciadas, acabam afligindo a saúde dos seres humanos. Dessa forma, tendo como base essas informações, abrimos caminho para o estudo literário das amebas de vida livre com foco *Acanthamoeba spp.* e *Naegleria fowleri*, e de suas possíveis manifestações patológicas no organismo humano.

4.5 Análise morfológica

4.5.1 *Acanthamoeba spp.*

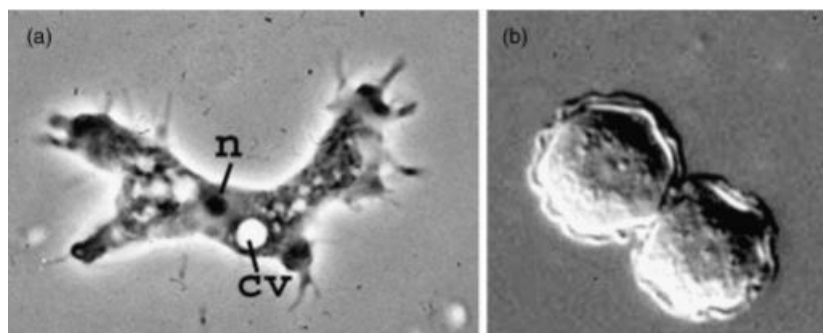
As espécies de *Acanthamoeba* estão entre os protozoários mais frequentes encontrados na natureza. Estão distribuídos em todo o mundo e foram isolados na poeira, ar, água doce natural e tratada, água do mar, piscinas, esgoto, sedimentos, filtros de ar condicionado, lentes de contato e em culturas de células. Já foram descritos relatos de isolamento em plantas, espécies de peixes, anfíbios, répteis e mamíferos; em destaque para a cavidade nasofaríngea de pessoas aparentemente saudáveis e pacientes imunodeficientes (CASTRILLÓN, J. C., & OROZCO, L. P. 2013).

A porta de entrada da ameba pode acontecer via nasal, permitindo que as mesmas migrem diretamente para o SNC, ou por injúrias em pele, com subsequente disseminação das amebas no SNC pela via hematogênica (SCHUSTER, F. L. 2002).

A *Acanthamoeba* apresenta dois estágios durante o ciclo de vida: Um vegetativo, caracterizado pela forma de trofozoíto (8 – 40 µm) e um estágio dormente, cuja forma evolutiva compreende o cisto (8 – 29 µm) (CALIXTO *et al.* 2014). O trofozoíto possui um único núcleo e projeções em seu corpo que são chamados de acantopódios, que facilitam a adesão às superfícies além da sua movimentação. Alimentam-se de bactérias, algas, fungos e pequenas partículas orgânicas, enquanto que sua replicação ocorre por fissão binária (KHAN, 2006).

O cisto é composto de uma parede dupla, a externa é definida como ectocisto, enquanto a parede interna é chamada de endocisto (CASTRILLÓN, J. C., & OROZCO, L. P. 2013). A parede externa ou ectocisto é mais ou menos ondulada e a mais interna ou endocisto pode apresentar-se poligonal, esférica ou estrelada. Os dois envoltórios são separados entre si, mas se unem nos ostíolos (PAGE, 1967; GIAZZI, 1996; SILVA, 2001). Também possuem em sua estrutura vacúolos contráteis, que tem como função a regulação osmótica.

Figura 3: (a) Trofozoíto e (b) cisto de *Acanthamoeba* - (n) e (cv) representando respectivamente o núcleo e o vacúolo contrátil.



Fonte: VISVEVARA *et al.*, 2007.

Pussard e Pons separaram em 1977 o gênero de *Acanthamoeba* em três grupos morfológicos baseados tanto no tamanho quanto na forma dos cistos:

Grupo I: Espécies *A. castellanii*, *A. divionensis*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. lugdunensis*, *A. mauritaniensis*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhysodes*, *A. stevensoni* e *A. triangularis* (WALOCHNIK, 2000; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). Consiste nas espécies que são caracterizadas por grandes amebas com cistos que variam em tamanho de 16 a 30mm (G. S. Visvesvara *et al.* 2007).

Grupo II: Espécies *A. castellanii*, *A. divionensis*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. lugdunensis*, *A. mauritaniensis*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhysodes*, *A. stevensoni* e *A. triangularis* (WALOCHNIK, 2000; MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). O grupo abrange o maior número de espécies, consistindo de amebas com cistos medindo cerca de 18mm (G. S. VISVEVARA *et al.* 2007).

Grupo III: Espécies *A. culbertsoni*, *A. healyi*, *A. jacobsi*, *A. lenticulata*, *A. palestinensis*, *A. postulosa* e *A. royreba* (MARCIANO-CABRAL e CABRAL, 2003). Também consiste em espécies com cistos medindo 18 mm ou menos, mas com diferenças sutis na morfologia do cisto. O agrupamento de espécies com base na morfologia é, no entanto, considerado não confiável devido às variações na morfologia dos cistos, uma característica crítica para a identificação de espécies, que pode ser causada por condições de cultura (G. S. VISVEVARA *et al.* 2007).

Acanthamoeba spp. pode ser facilmente cultivada em laboratório em placas de ágar não-nutriente revestidas com bactérias como *Escherichia coli*

ou *Enterobacter aerogenes*. Eles mostram uma preferência por bactérias que não são encapsuladas ou pigmentadas: a cápsula mucóide inibe a fagocitose pelas amebas e os pigmentos bacterianos são frequentemente tóxicos (VISVEVARA *et al.* 2007). Para que se obtenha parâmetros que possam servir como diferenciação entre os micro-organismos potencialmente patogênicos e os não-patogênicos, aplica-se o ensaio físico de patogenicidade, que inclui testes envolvendo a termotolerância e a osmotolerância dos parasitas isolados.

Com o avanço da tecnologia, foi possível desenvolver um modo mais específico para a caracterização e classificação do gênero *Acanthamoeba*, como descrito por Stothard *et al.*, a partir da sequência do DNA ribossomal 18S foram obtidos 12 genótipos (T1-T12), sendo os genótipos T3 e T4 responsáveis pela ceratite amebiana.

As vias de entrada da *Acanthamoeba* incluem o trato respiratório baixo e lesões na pele acompanhada de disseminação hematogênica. A *Acanthamoeba* acessa o sistema nervoso central (SNC) através da barreira hemato-encefálica, particularmente através do revestimento endotelial dos capilares cerebrais (MARTINEZ, 1991). Os achados microscópicos *post-mortem* revelaram a presença de cistos e trofozoítos, majoritariamente nos espaços perivascular no parênquima cerebral.

A *acanthamoeba*, dependendo das espécies e linhagens estudadas, produz proteinases de serina e cisteína, metaloproteinases, ativadores de plasminogênio e exibem respostas quimiotáticas aos extratos endoteliais da córnea. Estudos *in vitro* demonstraram que a *Acanthamoeba* ativa a via alternativa do complemento, independente da ativação de anticorpos. Em um hospedeiro imunocompetente, imunoglobulinas e componentes do complemento promovem o reconhecimento dessas amebas por neutrófilos, macrófagos e provavelmente linfócitos.

A via alternativa do complemento e a formação de anticorpos, dois importantes mecanismos de defesa, estimulam neutrófilos que liberam enzimas lisossômicas e intermediários reativos de oxigênio, incluindo o peróxido de hidrogênio, que por sua vez promovem a destruição das amebas. A própria ameba pode induzir toxicidade aos macrófagos, que é um fator importante na produção de reação granulomatosa (MARTINEZ, 1985).

4.5.2 *Naegleria fowleri*

Naegleria fowleri é um ameboflagelado, pois tem um estágio flagelado transitório, em forma de pêra, juntamente com trofozoítos amebóides e estágios de cisto resistente em seu ciclo de vida (VISVEVARA, 2007). Pertence à família Vahlkampfiidae (BRIGHT & GERBA, 2017) é o agente etiológico de uma doença transmitida pela água perigosa e devastadora conhecida como meningoencefalite amebiana primária (PAM), tanto em humanos quanto em animais. O PAM é uma doença rara, mas fatal, que afeta jovens adultos em todo o mundo, particularmente no mundo desenvolvido, mas relatado recentemente de países em desenvolvimento, com taxa de mortalidade de 95% a 99% (JAHANGEER *et al.*, 2019).

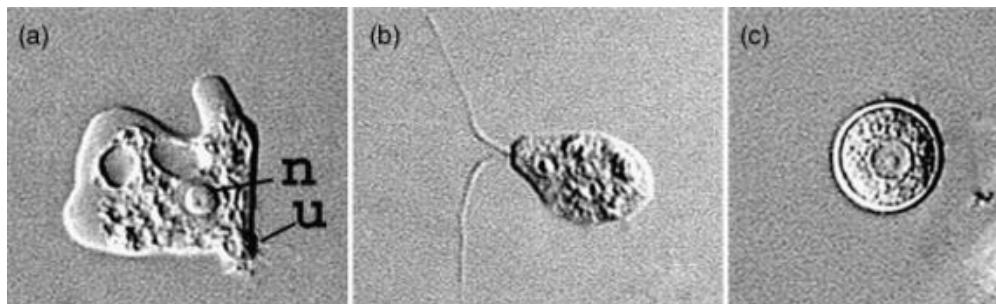
Apenas uma espécie, *N. fowleri*, é conhecida por causar infecção, embora duas outras espécies, *N. australiensis* e *N. italica*, podem causar infecção em camundongos após inoculação intranasal ou intracerebral. Estas espécies nunca foram identificadas em infecções humanas (VISVEVARA *et al.*, 2007).

Em condições adversas, tais como baixas temperaturas, a ameba se diferencia em cistos esféricos medindo entre 7 e 14 μm . Neste estágio, o único núcleo da ameba é protegido por um citoplasma extremamente granuloso envolvido por uma densa parede celular. Normalmente, a parede do cisto apresenta dois poros que estão preenchidos com muco até a indução do estágio de trofozoíto (CALIXTO *et al.*, 2014).

Dependendo das condições ambientais, a *N. fowleri* pode mudar seu fenótipo, e o trofozoíto é o reprodutor ativo estágio que exhibe em condições favoráveis e é considerado como estágio infeccioso. Tem um núcleo único e multiplica por fissão binária; a membrana nuclear permanece intacta durante essa divisão (um processo conhecido como pró-mitose). A temperatura apropriada para o melhor crescimento deste estágio é de 35 a 46 ° C. (JAHANGEER *et al.*, 2019). As formas flagelada e cística de *N. fowleri* não são re-estágios produtivos e não alimentares, enquanto apenas os trofozoítos podem reproduzir, alimentar e/ou tornar-se cisto. (SIDDIQUI *et al.*, 2016).

O trofozoíto entra num estágio em que não apresenta flagelo, geralmente com duas bolhas, quando a concentração iônica do meio muda. O temporário, em forma de pêra, estágio flagelado não divide nem alimenta, varia em comprimento de 10 a 16µm, e geralmente reverte para a forma amebóide dentro de uma hora ou menos. No laboratório, essa transformação pode ser induzida pela lavagem de amebas tróficas em água destilada ou solução salina diluída. O trofozoíto amebóide mede entre 10 e 30 µm de comprimento, o núcleo é escuro e central ao corpo celular e se locomove por lentos movimentos amebóides (VISVEVARA, 2007; CALIXTO *et al.*, 2014).

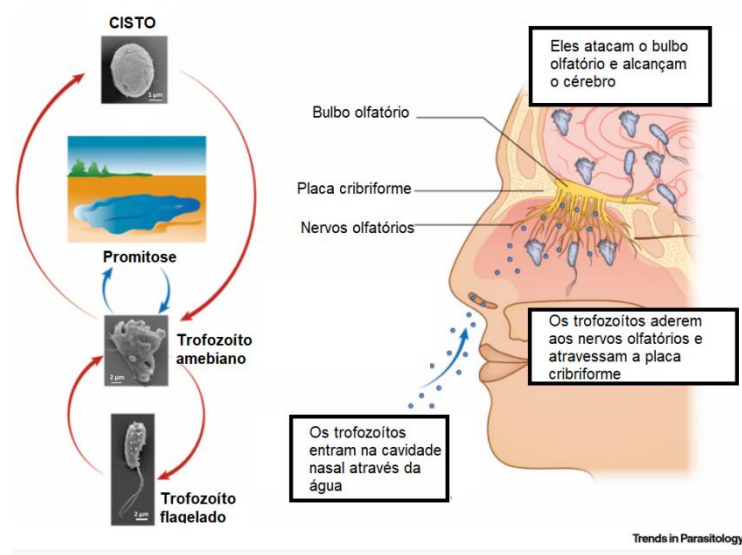
Figura 4: (a) Trofozoíto, (b) forma flagelada, e (c) cisto de *Naegleria fowleri* (Microscopia com o aumento de x1000)



Fonte: VISVEVARA, 2007

A maioria das infecções fatais causadas por *N. fowleri* ocorre em jovens expostos à água quente em lagos e piscinas, pois a *N. fowleri* é termofílica e geralmente encontrada em águas naturais e artificialmente aquecidas, em particular nas lagoas de resfriamento de usinas de energia, nas quais essa espécie pode proliferar intensamente (PELANDAKIS, 2002).

Figura 5: Ciclo de vida e mecanismo de patogenicidade simplificado da *Naegleria fowleri*. É possível que todas as três fases de *N. fowleri* atinjam ou invadam a mucosa nasal humana, mas apenas a forma amebóide trofozoíta foi isolado no líquido ou tecido cerebrospinal. É feito que, ao atingir a área nasal, o cisto rapidamente torna-se um trofozoito e forma flagelos antes de invadir o tecido nervoso nasal e olfativo.



Fonte: Adaptado de PIÑERO et al., 2019

Os pontos cruciais durante o combate a *N. fowleri* incluem sua detecção, seu modo de dispersão como espécie não patogênica e patogênica presentes no meio ambiente. Existem diferentes métodos para identificar especificamente *N. fowleri*, como imunológico ou molecular, outros métodos recentes também estão incluídos (PIÑERO et al., 2019).

4.6 Infecções por *Acanthamoeba* spp. e *Naegleria fowleri*

É através das descrições e relatos médicos, que se tem o embasamento da importância sobre as amebas de vida livre quanto ao desenvolvimento de infecções nos seres humanos, principalmente quando se refere aos indivíduos imunocomprometidos, e da gravidade que essas doenças podem ser. Por isto, é necessário evidenciar as infecções de maior relevância e com maior índice de acometimento pela *Acanthamoeba* spp. e *Naegleria fowleri*, sendo estes, quadros apresentados à partir do contato de pacientes principalmente com a água, o que aumenta ainda mais o alerta em como o ambiente hospitalar pode ser um grande vetor para as seguintes doenças.

4.6.1 Ceratite por *Acanthamoeba spp.*

O primeiro caso de infecção ocular por *Acanthamoeba* foi relatado em 1974. Desde então, muitos casos foram relatados, a maioria deles de forma unilateral, porém, casos bilaterais também foram descritos. Em pacientes não usuários de lentes de contato, a infecção tradicionalmente tem sido associada a trauma grave e exposição subsequente a água contaminada ou solo. Esta infecção também é comumente associada ao desgaste das lentes, principalmente as gelatinosas descartáveis (ARANCE-GIL *et al.*, 2014).

A ceratite amebiana é a infecção da córnea por espécies do gênero *Acanthamoeba* e ocorre basicamente em indivíduos imunocompetentes (TRABELSI, 2012). Essa condição foi notada primeiramente em indivíduos que sofreram traumas na córnea, e devido à lesão na superfície da córnea houve a infecção pelo microorganismo (SCHUSTER, 2002). Os principais fatores de risco são: i) uso prolongado de lentes de contato; ii) injúrias na córnea; iii) soluções não-estéreis para manutenção de lentes de contato; iv) prática de natação em águas contaminadas (CALIXTO *et al.* 2014). A ceratite amebiana progride lentamente quando comparada à evolução de outros agentes infecciosos, o que pode estar relacionado com a velocidade de multiplicação deste microorganismo que é mais lenta do que a de outros agentes infectantes, ou pode ser decorrente de uma barreira corneal mais eficaz para este agente (ALVARENGA, 2000).

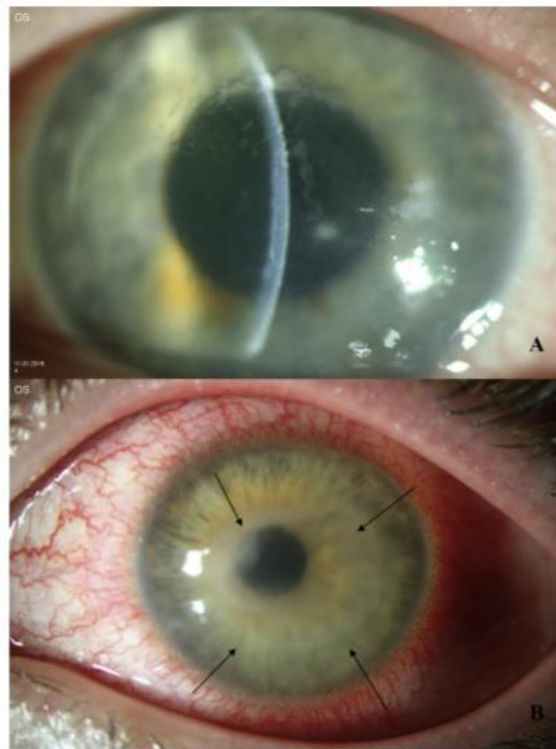
Esta infecção é altamente resistente a terapias e, muitas vezes, resulta em uma deficiência acentuada total ou até uma perda total do olho afetado. Quando a infecção é grave o suficiente, pode levar à abrasão na córnea causando opacidade, a irite e já frequentemente à esclerite. Os sintomas causados incluem vermelhidão, epífora, dor intensa, fotofobia e edema. (OROZCO, 2013).

Os sinais clínicos da ceratite por *Acanthamoeba* são os seguintes:

- Alterações epiteliais do tipo camaleão ("epitélio sujo", epiteliopatia pseudodendritiforme, micro-erosões epiteliais e micro-cistos)
- Infiltrados estromais multifocais
- Infiltrado em anel ("anel imensamente imune")

- Infiltrado perineuro periférico
- Complicações comuns: sinéquias anteriores de base ampla, glaucoma secundário, atrofia da íris, catarata madura, defeito endotelial persistente
- Complicações raras: uveíte anterior estéril, esclerite
- Complicações muito raras: coriorretinite e retina vasculite (SZENTMARY N, *et al.*, 2018).

Figura 6: “Epitélio sujo” (A), infiltrado em anel (setas) (B)



Fonte: Adaptado de SZENTMARY N, *et al.*, 2018

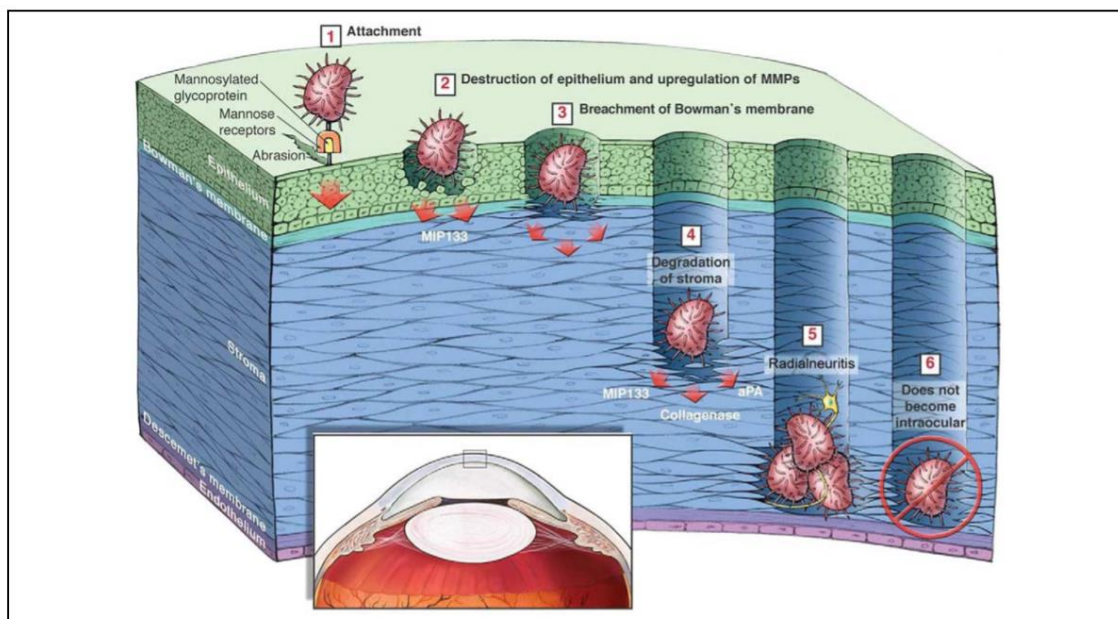
Um dos problemas mais sérios e preocupantes nas infecções oculares por *Acanthamoeba* é a deficiência de um diagnóstico rápido e correto. A porcentagem de um diagnóstico errado costuma ser muito alta. Na maioria dos casos, o diagnóstico efetuado refere-se à presença de herpes, fungos e bactérias. A presença de *Acanthamoeba* muitas vezes só é detectada através de raspado ou biópsia corneana, somente após a remoção da córnea (LLINGWORTH & COOK, 1998; SCHAUMBERG *et al.*, 1998).

Segundo Szentmary N *et al.* (2018), atualmente cerca de 5% das ceratites associadas à lentes de contato são causadas por *Acanthamoeba*. Com base nos resultados de um estudo, foi comprovado que apenas peróxido

de hidrogênio contendo limpadores de lentes de contato é eficaz contra todas as estirpes de *Acanthamoeba*. No caso de uma infecção da córnea, como mecanismo de patogenese, a *Acanthamoeba* está ligada às células epiteliais da córnea através da proteína de ligação à manose. Essa ligação suporta a secreção de metaloproteinase, serina e cisteína proteinase através da ameba, que resulta em efeitos citotóxicos nas células epiteliais da córnea e queratócitos, suportando profunda penetração corneana da *Acanthamoeba*. A mesma também pode migrar pelos nervos da córnea e danificá-los.

Abaixo (Figura 7), esquematicamente, podemos analisar melhor este processo:

Figura 7: A cascata patogênica da ceratite por *Acanthamoeba*. (1) Os trofozoítos de *Acanthamoeba* aderem às glicoproteínas manosiladas, que são reguladas positivamente em resposta a abrasão da córnea, no epitélio da córnea. (2) A exposição à manose induz os trofozoítos de *Acanthamoeba* a liberar MIP133, que é extremamente citolítico para a córnea. células epiteliais *in vitro*. (3) Os trofozoítos, rompem a membrana de Bowman e entram no estroma. (4) Os trofozoítos continuam a produzir várias proteases que contribuem para a dissolução do estroma da córnea. Estes incluem MIP133, uma collagenase, uma MMP e um novo ativador de plasminogênio *Acanthamoeba* (aPA). (5) Trofozoítos geralmente se agrupam em torno dos nervos da córnea, produzindo queratoneurite radial e dor extrema. (6) A queratite por *Acanthamoeba* raramente progride além do endotélio da córnea para produzir infecções intra-oculares.



Fonte: CLARKE & NIEDERKORN, 2006

4.6.2 Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG)

Acanthamoeba spp. e *Balamuthia mandrillaris* podem causar encefalite amebiana granulomatosa (EAG), uma infecção considerada oportunista, pois quase todos os casos relatados até o momento se referem a indivíduos imunologicamente debilitados, especialmente àqueles que sofreram algum tipo de terapia ou situação imunossupressora, como alcoolismo, gravidez, quimioterapia ou uso de antibióticos de amplo espectro (CARLESSO *et al.*, 2007).

Relatos iniciais da doença em humanos sugeriram que a imunossupressão ou a imunodeficiência era um importante fator de risco para determinar a suscetibilidade, mas a doença também ocorreu em crianças e adultos imunocompetentes (BAKARDJIEV, 2003). A porta de entrada são lesões na pele contaminadas por solo, ou cistos transportados por correntes de ar através do trato respiratório (TRABELSI, 2012).

A EAG, como uma doença oportunista, afeta hospedeiros cuja meta-integridade biológica, fisiológica ou imunológica são comprometidas e, portanto, os casos podem ocorrer em qualquer época do ano sem padrão de ocorrência sazonal. Várias espécies de *Acanthamoeba* (*A. culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. healyi* e *A. divionensis*) são conhecidas por causar EAG, principalmente em pacientes com HIV / AIDS ou doentes crônicos, diabéticos, que foram submetidos à plantação ou estão enfraquecidos com um recente histórico de exposição à água doce recreativa (VISVEVARA, 2007). Os casos de EAG não são frequentes, mas altas taxas de mortalidade foram observadas (PARIJA, 2015).

A penetração das amebas no sistema nervoso central (SNC) provavelmente é por hemato-disseminação genética de um foco primário na respiração, trato gastrointestinal ou pele, mas os trofozoítos amebianos ou cistos podem atingir o SNC diretamente através da via olfativa neuroepitélio. (MARTINEZ, 1994).

Dentro dos sintomas clínicos característicos dessa patologia, há alterações no estado mental, mudanças no comportamento, convulsões, dor de cabeça, afasia, febre, rigidez no pescoço, visão prejudicada, anorexia, náusea e vômito, ataxia, coma e morte (OROZCO, 2013).

As infecções cutâneas e respiratórias podem se desenvolver por vários meses, mas o envolvimento do SNC pode causar consequências fatais dentro de dias ou semanas. Os mecanismos patogênicos até agora não são claros. As lesões foram mais observadas nos gânglios da base, mesencéfalo, tronco cerebral e hemisférios cerebrais com lesões características no parênquima do SNC, resultando em encefalite granulomatosa crônica (TRABELSI, 2012).

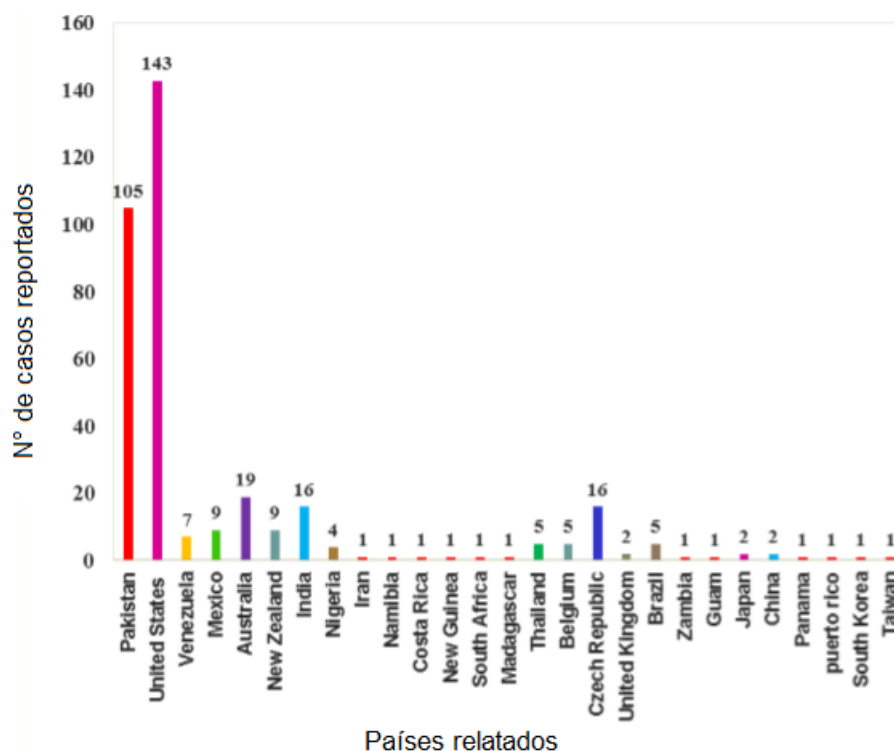
Casos de EAG com sequelas pós-infecciosas de doenças neurocognitivas e distúrbios foram notados. Essas sequelas são devidas ao extenso edema cerebral que se desenvolve durante o curso da doença e, portanto, precisa ser gerenciada meticulosamente para evitar essa complicação nos sobreviventes. Melhor sobrevida e prognóstico foram observados em idosos quando comparados à faixa etária mais jovem / média de indivíduos (CARY *et al.*, 2010).

4.6.3 Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP)

A *Naegleria* está associada à Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP), uma infecção fulminante, rapidamente fatal do sistema nervoso central (SNC). Por ocorrer principalmente em indivíduos saudáveis, o organismo não é considerado como uma ameba oportunista, assim como a *Acanthamoeba*, mas como um patógeno (VISVEVARA, 2007). Durante o contato com a água, a *Naegleria fowleri* é aspirada para dentro das passagens nasais e, após se aderirem à mucosa nasal, a ameba migra para o cérebro por meio do nervo olfativo, resultando em grandes danos no lobo frontal (GUPTA *et al.*, 2009).

O primeiro caso de MAP foi relatado na Flórida, EUA, em 1962. O nome *Naegleria fowleri* foi dado a ele após a descoberta da meningoencefalite amebiana primária (MAP) na Austrália em 1965, por Malcom Fowler, do Adelaide Children's Hospital, Austrália e RF Carter, que primeiro descreveram esta doença. O nome “meningoencefalite amebiana primária” foi dado em 1966 por Butt e depois em 1968 por Carter para diferenciá-lo da rara invasão cerebral causada por *Entamoeba histolytica* (JAHANGEER *et al.*, 2019).

Figura 8: Casos de MAP notificados em todo o mundo devido a *Naegleria fowleri* até 2017



Fonte: JAHANGEER *et al.*, 2019

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América (EUA) - CDC, o número de casos de MAP nos EUA desde 1962 em 2015 foi de 138. Recentemente, nos países asiáticos, um aumento no número de casos de MAP foi investigado. Com relação à ocorrência de MAP, nos EUA foram relatados 143 casos de 1962 a 2016, 139 dos quais foram fatais. Cerca de 440 casos são registrados em todo o mundo (JAHANGEER *et al.*, 2019).

Apesar das melhorias no diagnóstico, quimioterapia antimicrobiana e cuidados de suporte, a mortalidade associada ao MAP permaneceu mais de 95%, indicando (i) a natureza virulenta desse patógeno e (ii) a falta de tratamento eficaz contra essa doença. Foram notificadas infecções por *N. fowleri* em indivíduos saudáveis, principalmente crianças e jovens adultos com histórico de natação, banho, ablução (ritual) ou irrigação nasal (MUNGROO *et al.*, 2019) Pesquisas revelaram que a infecção não pode ser iniciada bebendo água contaminada (SHAKEEL, 2016).

Os sintomas clínicos são caracterizados por início repentino bifrontal ou dor de cabeça bitemporal, febre alta, rigidez do pescoço, seguida de náuseas, vômitos e irritabilidade. Em estágios avançados da infecção, fotofobia e doenças neurológicas são alterações observadas, como letargia, convulsões, confusão, coma, diplopia ou comportamento estranho, que leva à morte dentro de uma semana (PIÑERO *et al.*, 2019). A característica marcante do MAP é o rápido início dos sintomas após a exposição. A doença progride e, sem diagnóstico e intervenção imediatos, a morte geralmente ocorre rapidamente (VISVEVARA *et al.*, 2007).

Jahangeer *et al.* (2019) elucida que, embora o mecanismo de patogênese do MAP não esteja bem entendido, considera-se que a *N. fowleri* evoluiu mecanismos causadores de evasão do sistema imunológico do hospedeiro, razão pela qual pode ser considerado um patógeno de sucesso. Foi investigado que as amebas estão presas por um muco hospedeiro nos estágios iniciais da infecção. A ativação da defesa inata ocorre nas células epiteliais respiratórias, incluindo inflamação (IL-8 e IL-1 beta) e secreção de mucina (MUC5AC) pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), em exposição à *N. fowleri*.

A mucina causou inibição da citotoxicidade *in-vivo*, *in-vitro* e na ligação da *Naegleria fowleri* às células, mas há reação inflamatória induzida por poucos patógenos desta espécie após sua penetração no epitélio. Durante os estágios finais da infecção, observaram-se neutrófilos e eosinófilos ao redor da ameba. Experiências foram realizadas em camundongos para determinar o papel da inflamação em danificar os tecidos, o que demonstra que os danos ao sistema nervoso central (SNC) são causados pela ação da lise celular polimorfonuclear (PMN) do hospedeiro e resposta inflamatória.

O MAP também foi associado à ablução, prática entre grupos religiosos. Em particular, os muçulmanos rezam cinco vezes por dia. A ablução é realizada antes de cada oração, para limpeza. Realizar a ablução envolve lavar as mãos, boca, rosto, nariz, orelhas, braços e pés. No entanto, ao limpar o nariz, muitas pessoas dirigem a água pelas narinas com força, apesar de não ser uma parte obrigatória da ablução (SIDDIQUI *et al.*, 2016).

Aproximadamente 310 casos de PAM foram relatados internacionalmente, principalmente dos Estados Unidos, Austrália e Europa.

Há apenas sete sobreviventes do PAM relatados na literatura ocidental. Da Índia, apenas dois sobreviventes da meningite por *Naegleria* foi relatada até o momento (GUPTA, 2019).

4.7 Métodos diagnósticos

4.7.1 Ceratite por *Acanthamoeba* spp.

O diagnóstico definitivo baseia-se na visualização de amebas mediante exame microscópico de raspagem, biópsia da córnea ou no seu cultivo a partir de tecidos afetados. Mais recentemente, a microscopia focal tem sido utilizada como auxílio no diagnóstico de ceratite por *Acanthamoeba* (JOSLIN *et al.*, 2006; PAMAR *et al.*, 2006). As amebas isoladas de infecções por ceratite geralmente têm temperaturas ideais mais baixas do que os isolados de encefalite amebiana granulomatosa (EAG), consistentes com a localização da superfície.

A imunotransferência foi usada para testar soros de pacientes com ceratite, bem como de pacientes não portadores da doença, quanto a anticorpos anti-*acanthamoeba*. Significativamente, os soros de pacientes com ceratite apresentaram baixos níveis de IgA, um anticorpo secretor, indicando talvez maior suscetibilidade à ceratite (CLARKE& NIEDERKORN, 2006). Em um estudo anterior, anticorpos imunofluorescentes e precipitina contra *Acanthamoeba* foram demonstrados em pacientes com ceratite amebiana (JONES *et al.*, 1975; CLARKE& NIEDERKORN, 2006).

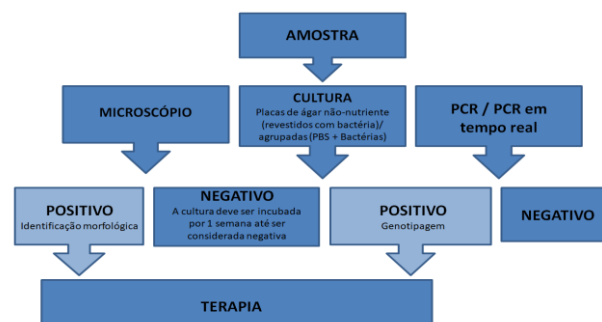
Tabela 1: Para a ceratite por *acanthamoeba* são utilizadas microscopia confocal *in-vivo* e como diagnóstico *in-vitro*, a Polymerase-chainreaction (PCR), exame histopatológico ou cultura microbiológica.

Método de diagnóstico	Material analisado	Sensibilidade
Microscopia confocal <i>in-vivo</i>	Exame da córnea <i>in-vivo</i>	Acima de 90% com examinador experiente
Polymerase-chain reaction (PCR)	Raspagem da córnea (epitélio) na biópsia da córnea, estojo da lente de contato e solução de limpeza	84-100%
Cultura <i>in-vivo</i>	Raspagem da córnea (epitélio) na biópsia da córnea, estojo da lente de contato e solução de limpeza	0-77%
Análise histopatológica	Raspagens da córnea ou excisão ou tecido explantado de ceratoplastia	31-65%

Fonte: SZENTMARY N, *et al.*, 2018

Em casos de suspeita de ceratite parasitária por *Acanthamoeba*, em que não se confirme a etiologia através do raspado corneal (lâminas e culturas) a biópsia corneal é o método adicional de escolha para se identificar o parasita. Deve-se incisar o epitélio e pequena espessura do estroma anterior na região de maior infiltração corneal, englobando também região adjacente menos acometida. No momento da biópsia deve-se colher novos raspados para lâminas e culturas. O material retirado de olhos submetidos à ceratoplastia tectônica com suspeita de etiologia amebiana deve ser analisado através de esfregaços, culturas e exame histopatológico (ALVARENGA, 2000).

Figura 9: Visão geral do procedimento de diagnóstico para ceratite por *Acanthamoeba* spp.



Fonte: Adaptado de LORENZO-MORALES *et al.*, 2015

4.7.2 Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG)

O diagnóstico é estabelecido *post-mortem* na grande maioria dos casos relatados. Vários casos de EAG foram documentados com maior incidência em homens. A dificuldade no diagnóstico é provavelmente multifatorial; a raridade da doença, disponibilidade limitada de estudos diagnósticos, ensaios clínicos e radiológicos inespecíficos para apresentações biológicas (LAU *et al.*, 2019).

Na EAG, a biópsia cerebral com imuno-histoquímica e estudos de PCR e PCR são o diagnóstico padrão-ouro e ambos estão disponíveis no CDC. A *Acanthamoeba spp.* pode ser visualizada com manchas (por exemplo, tricrômico, hematoxilina e eosina (H&E)) e manchas imuno-histoquímicas no tecido cerebral (QVARNSTROM Y; VISVEVARA GS; SRIRAM R, *et al.*, 2019) Não existe tratamento universalmente eficaz para a GAE, em parte, devido ao pequeno número de casos e ao atraso no diagnóstico (LAU *et al.*, 2019).

Como pontuado por Parija *et al.*, em 2015, a detecção microscópica das formas morfológicas do parasita (trofozoítos e cistos) tem sido o método convencional e comum utilizado para o diagnóstico de EAG. Líquido cefalorraquidiano (LCR), biópsia de pele / seio / pulmão e biópsia de tecido cerebral (ressecção pós-cirúrgica / *post-mortem*) foram as amostras de escolha para diagnóstico dessas infecções.

Geralmente lesões na pele são encontradas na face ou nas extremidades como placas eritematosas/ úlceras. Considerando que na meningoencefalite amebiana primária (MAP), causada pela *Naegleria fowleri*, muitos trofozoítos são visualizados na montagem úmida do LCR, portanto, o exame do LCR não é o método de escolha para descartar infecções por EAG. Exame histopatológico (HPE) dos tecidos de biópsias (pele/cérebro) apresentam alto rendimento de detecção de infecções por EAG.

Ambas as formas morfológicas (cisto e trofozoítos) pode ser demonstrados em HPE de amostras parafinizadas fixadas em formalina. A imuno-histoquímica (IHC) tem sido amplamente utilizada na detecção das formas morfológicas do parasita. Anticorpos específicos direcionados aos antígenos amebianos são adicionados à amostra, subsequentemente com o conjugado enzimático e substrato, adicionado para detectar os antígenos. Considerando que, nos casos de EAG, o início é subagudo a crônico, com

duração de semanas / meses antes de progredir para doença grave. Nestes casos, a detecção de anticorpos é confiável e preferível, pois é um procedimento não invasivo e ajuda na detecção precoce de casos. Vários métodos, como ELISA e citometria de fluxo foram empregados na detecção de anticorpos.

Se o diagnóstico permanecer indefinido após uma extensa investigação, seções em vários níveis devem ser realizadas em instituição mais avançada, pois lesões podem ser poucas e focais em infecções amebianas. (LAU *et al.* 2019)

4.7.3 Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP)

Técnicas moleculares como cadeia de reação da polimerase (PCR) são mais sensíveis, rápidos e específicos em comparação à cultura e técnicas microscópicas. A quantificação direta, determinação e detecção de microrganismos em amostras ambientais pode ser feita particularmente por PCR quantitativo (qPCR), sem a necessidade de isolamento e métodos de diagnóstico baseados em PCR em tempo real podem tornar-se ferramentas eficientes e úteis quando implementadas na rotina prática de laboratório.

O teste de patogenicidade em camundongos e testes de temperatura a um máximo de 45 ° C foram usados inicialmente para a identificação de isolados de *Naegleria fowleri*. Posteriormente para a identificação de *N. fowleri*, foram utilizadas isoenzimas e anticorpos. A digitação de diferentes linhagens de *N. fowleri* e *Naegleria spp.* foi feito usando cariotipagem eletroforética (KE) e comprimento do fragmento de restrição de polimorfismo (RFLP) (DE, 2011).

O diagnóstico definitivo de PAM envolve achados do líquido cefalorraquidiano (LCR), ou seja, presença de amebas no LCR. Na maioria dos casos, trofozoítos móveis são observados no LCR por montagem úmida (SIDDIQUI *et al.*, 2016).

A ameba também pode ser detectada inoculando material de biópsia ou fluido cérebro-cefalorraquidiano revestidos por bactéria (geralmente *Escherichia coli*) em ágar não-nutriente. *N. fowleri* também pode ser detectado nas amostras através de imuno-histoquímica. A PCR geralmente é o método de escolha, pois oferece um método sensível e rápido para identificar o

parasita e, portanto, vários conjuntos de *primers* foram desenvolvidos para a identificação de *N. fowleri* (MUNGROO et. al., 2019).

A maioria das lesões são encontradas dentro e ao redor dos lobos orbitofrontal e temporal, base do cérebro, hipotálamo, mesencéfalo, ponte, medula oblonga e porção superior da medula espinhal. A tomografia computadorizada pode mostrar obliteração das cisternas ao redor do mesencéfalo e espaço subaracnóideo sobre os hemisférios cerebrais (VISVEVARA et al., 2007).

4.8 Tratamentos

CERATITE AMEBIANA GRANULOMATOSA

Os regimes de tratamento relatados na literatura têm variado amplamente dependendo da extensão da doença relatada, a saúde geral da córnea e a experiência pessoal do médico (CLARKE, 2006).

Como citado por Lorenzo-Morales et al. (2015), atualmente não existem métodos ou um único medicamento que possa eliminar as formas de cisto e trofozoítos, enquanto a forma de trofozoíto é muito mais facilmente eliminada. O tratamento atual da ceratite por *Acanthamoeba* consiste em antimicrobianos tópicos, agentes que podem atingir altas concentrações no local de infecção. Além disso, devido à existência de uma forma de cisto na *Acanthamoeba*, que é altamente resistente à terapia, uma combinação de agentes é geralmente usado.

PHMB (Poli-hexametilenobiguanida) e clorexidina foram relatados como sendo os medicamentos mais eficazes para o tratamento da infecção e em combinação relataram que são eficazes contra ambos os cistos e trofozoítos (DART et al., 2009; LIM et al., 2008; LORENZO-MORALES et al., 2013; POLAT, 2014; UEKI et al., 2009). Em relação a esses dois medicamentos, é importante mencionar que eles são ativos contra um amplo espectro de patógenos, aumentando a memória citoplasmática e a permeabilidade das membranas. Clorexidina e PHMB contêm moléculas positivas altamente carregadas, capazes de se ligar ao tampão de mucopolissacarídeo do ostíolo, resultando em penetração da ameba. O medicamento então se liga à bicamada

fosfolipídica da membrana celular que é carregada negativamente resultando em dano, *lise* celular e morte (LORENZO-MORALES *et al.*, 2015).

A ceratoplastia penetrante terapêutica deve ser considerada quando o processo infeccioso se espalha pela a córnea para o centro do estroma apesar da terapia anti-amebiana máxima (COHEN *et al.*, 1985). A execução deste procedimento em uma infecção mais localizada pode permitir remoção total dos organismos por extirpação do tecido envolvido, bem como uma borda de córnea clara ao redor.

Um recente estudo demonstrou que particularmente o hexadecilfosfocolina (miltefosina) é altamente eficaz também contra várias estirpes de *Acanthamoeba*. Além disso, foi aplicado em combinação com PHMB em ceratites por *Acanthamoeba* na Áustria com resultados bem sucedidos (LORENZO-MORALES *et al.*, 2015).

ENCEFALITE AMEBIANA GRANULOMATOSA (EAG)

Os antibióticos comumente usados são pentamidina, cotrimoxazol, isetionato de propamidina, azóis como fluconazol, itraconazol e voriconazol, anfotericina B, flucitosina, rifampicina, azitromicina, amicacina, etc. (SCHUSTER & VISVEVARA, 2004). As drogas recentemente introduzidas que foram utilizadas com sucesso no tratamento de infecções por EAG são as drogas anticâncer como miltefosina, agentes fenotiazínicos e tioridazina, embora os últimos dois medicamentos tivessem que ser interrompidos durante o tratamento por causa da toxicidade severa. Uma combinação de vários antibióticos (aproximadamente 4-5) foram usados em casos tratados com sucesso de infecções por EAG, exceto em dois casos de acanthamoebíase do SNC, em que um único medicamento (cotrimoxazol) foi eficaz (PARIJA *et al.*, 2015).

Há pobre eficácia dos medicamentos antiparasitários tradicionais, como metronidazol e albendazol, e embora a miltefosina não esteja mais disponível no CDC, está disponível comercialmente e 26 relatos de casos sugeriram aumento da sobrevida (LAU *et al.* 2019).

Nos estudos de Kulsoom H., *et al.* (2014), quando testado contra *Acanthamoeba castellanii*, os resultados revelaram que a amlodipina, clorperazina, loperamida, amiodarona, prociclidina, digoxina e apomorfina

exibiu efeitos amebicidas, enquanto o haloperidol exibiu efeitos citotóxicos mínimos.

Tabela 2: Drogas clinicamente disponíveis testadas em combinação no estudo de KULSOOM, H., *et al.*, em 2014 e seu mecanismo de ação conhecido.

Drogas	Mecanismo de ação	Combinações de medicamentos testados no estudo
Amiodarona	Antiarrítmico classe III, a amiodarona apresenta bloqueadores beta e bloqueadores de canais de potássio como ações; Ligação ao receptor nuclear da tireóide	1. Haloperidol + loperamida 2. Proclorperazina + loperamida 3. Prociclidina + loperamida 4. Proclorperazina + apomorfina 5. Digoxina + amlodipina 6. Apomorfina + haloperidol 7. Prociclidina + amiodarona
Amlodipina	Antagonista dos canais de cálcio que inibe o influxo transmembranar de íons cálcio nos músculos lisos vasculares, músculo cardíaco; Atua como inibidor funcional da esfingomielinase e esfingomielina ácida; está envolvido na transdução de sinal, apoptose ou morte celular	
Apomorfina	Receptor agonista dopaminérgico não seletivo (D); Antagonista dos receptores 5-HT e o-adrenérgicos	
Digoxina	Liga-se à cadeia ATPase alfa-1 transportadora de sódio / potássio para inibir sua função no músculo cardíaco e outros tecidos;	

	Inibidor da enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol, mitocondrial
Haloperidol	Antagonista da dopamina; Antagonista do receptor muscarínico; Antagonista da histamina
Loperamida	Agonista dos receptores opióides μ ; Ligante de calmodulina
Proclorperazina	Receptor antagonista da dopamina (D2); Antagonista do receptor muscarínico; Antagonista da histamina
Prociclidina	Bloqueia o neurotransmissor acetilcolina no sistema nervoso central e periférico de receptores muscarínicos

Fonte: Adaptado de KULSOOM, H., *et al.*, 2014

A maioria dos medicamentos utilizados no tratamento são amebistáticos com poucos sendo amebicidas em concentrações terapêuticas. Portanto, a duração do tratamento é de meses para erradicar completamente o parasita (PARIJA *et al.*, 2015).

MENINGOENCEFALITE AMEBIANA PRIMÁRIA (PAM)

Embora alguns medicamentos comumente empregados no tratamento com PAM apresentem resultados positivos (por exemplo, anfotericina B e miltefosina), não está realmente claro se a doença pode ser curada com sucesso usando uma combinação determinada deles. Essa terapia combinada tem sido comumente aplicado nos últimos cinco anos. Mesmo quando tratados sob terapêutica semelhante abordagens, a taxa de mortalidade ainda é de cerca de 95% dos casos (BELLINI *et al.*, 2018).

Segundo Schuster *et al.* (2006), a administração de medicamentos é um problema essencial para o tratamento do sistema nervoso central (SNC)

infecções amebianas. Atingir o local da infecção nas concentrações efetivas é dificultado pela barreira hematoencefálica.

Por outro lado, o transporte para o parênquima cerebral através do sangue apresenta um pequeno problema. Ser capaz de alcançar com sucesso o parênquima cerebral é um fator muito importante que influencia a eficácia do tratamento. Portanto, a busca por moléculas que apresentem essas características e com efeitos amebicidas atraentes, pode melhorar o arsenal terapêutico contra *N. fowleri*.

O medicamento de escolha para tratar *N. fowleri* é a anfotericina B antifúngica, mas não é aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para esta indicação. O tratamento com anfotericina B requer alta dosagem (1,5 mg/kg/dia por via intravenosa em 2 doses × 3 dias, depois 1 mg/kg/dia × 6 dias mais 1,5 mg/dia por via intratecal × 2 dias, depois 1mg/dia em dias alternados × 8 dias) e seu uso está freqüentemente associado à toxicidade renal, manifestada como azotemia e hipocalcemia. A anfotericina B também pode causar anemia e muitos dos pacientes experimentam calafrios, febre, náusea, vômito e dor de cabeça. Além disso, não mais que uma dúzia de pessoas com PAM foram tratadas com sucesso em todo o mundo apenas com anfotericina B ou em combinação com outros medicamentos (JAHANGEER *et al.*, 2019).

4.9 Plano de justificativa

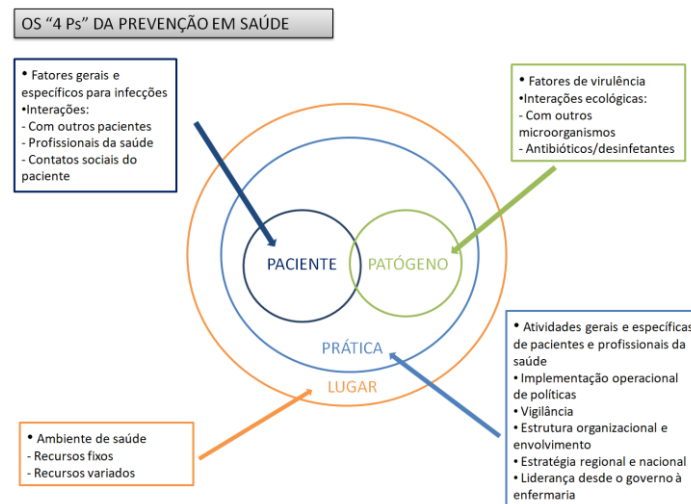
No ambiente microscópico em que vivem as amebas de vida livre como a *Acanthamoeba spp.* e a *Naegleria fowleri*, existe uma grande vantagem chamada: a ocasionalidade. Tratando-se principalmente da *Acanthamoeba*, sabe-se da versatilidade de ambientes em que ambas podem estar presentes. Por essas duas espécies, por estarem presentes livremente na natureza e em diversos outros locais, a incidência acidental se torna uma possibilidade atenuada e, conseqüentemente, o desenvolvimento das patologias de gravidade consideráveis como as encefalites, acometimento oftálmico merecem destaque, além de poderem carrear outros micro-organismos como espécies de bactérias, vírus e fungos à partir de relações de endossimbiose, tornando preocupante o possível contato com o ser humano.

O grande destaque desta revisão, é trazer para a discussão planos de enfoque e percepções sobre o desconhecimento da sociedade acerca esses patógenos e das condições que o meio hospitalar pode propiciar, em desenvolvimento de infecções nosocomiais, quanto um potencial habitat para o surgimento de doenças em indivíduos que permeiam as dependências, principalmente grupos de risco, como crianças, idosos e pacientes imunocomprometidos.

Jenkins (2017), definiu as infecções nosocomiais como aquelas que não estavam presentes ou incubadas no momento da admissão do paciente no hospital, então, qualquer infecção que se tornar aparente, horas após admissão hospitalar, pode ser considerada nosocomial, o que infelizmente torna o manejo das mesmas mais delicadas, pois geralmente requer internação prolongada, investigações adicionais, intervenção cirúrgica, tratamentos diversos, empregando um grande custo à saúde do paciente.

As infecções nosocomiais respondem por 7% nos países desenvolvidos e 10% nos países em desenvolvimento. Como essas infecções ocorrem durante a internação hospitalar, causam permanência prolongada, incapacidade e alta carga econômica. As infecções prevalentes incluem as da corrente sanguínea associadas à linha central, infecções do trato urinário associadas ao cateter, infecções do sítio cirúrgico e pneumonia associada ao ventilador. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 15% de todos os pacientes hospitalizados sofrem com essas infecções. Durante a hospitalização, o paciente é exposto a patógenos através de diferentes fontes, equipe de saúde e outros pacientes infectados (KHAN *et al.*, 2017).

Figura 10: Os “4Ps” da prevenção em saúde.



Fonte: Adaptado de JENKINS, 2017

Um dos veículos mais comuns apontados é a água, presente de diversos modos, acessível a todos dentro do ambiente hospitalar e utilizada de inúmeras formas, tanto para atos mais simples como beber água e lavar o rosto, como para fins de grande escala de importância como cirurgias e lavagens de instrumentos hospitalares.

A ocorrência de amebas de vida livre pertence aos gêneros *Acanthamoeba*, *Naegleria* e, em menor escala, a *Vermamoeba* que foi isolado na água potável, torres de resfriamento, águas recreativas e água do hospital. Com o desenvolvimento progressivo de vários sistemas antropogênicos de água artificiais, os seres humanos são cada vez mais expostos a amebas. (SOARES *et al.*, 2017). Essas AVL são resistentes a extremas condições de temperatura e pH, assim como ao cloro e outros sistemas de desinfecção (BOROVIEC *et al.*, 2016) aumentando a dificuldade para se manter a prevenção e o controle dessas amebas.

Diversos instrumentos e meios de distribuição que viabilizam água, como torneiras, bebedouros, cateteres, etc, facilitam a formação de biofilmes. Os biofilmes servem para as fontes básicas de alimento e de proteção das AVL, onde as mesmas aderem os trofozoítos nas superfícies, e eles interagem com muitos micro-organismos diferentes em suas biocenoses, especialmente nesses biofilmes. Enquanto a AVL geralmente usa bactérias e outros micro-organismos como fontes de alimento, alguns dos organismos presos

conseguem sobreviver dentro de seus predadores ou até proliferar dentro de seu citoplasma ou núcleo (BALCZUN & SCHEID, 2017), o que reforça ainda mais a problemática do acometimento que vai além do comensal, podendo tornar-se acidental, e que apesar de poucos registros de pacientes apresentando tais patologias, pode-se fazer um levantamento de diversos estudos quanto ao isolamento de amebas potencialmente patogênicas em ambientes hospitalares, como por exemplo, Carlesso (2006) e Crozetta (2007), que isolaram cepas de *Acanthamoeba* em todos os ambientes hospitalares investigados nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná, respectivamente, dentre outros estudos já citados nesta revisão.

A falta de conhecimento e de uma maior investigação em geral tornar-se o maior agravamento quanto a esta temática, pois a informação serve como uma grande medida preventiva e de controle dessas patologias de cunho fatal.

5.0 Prevenção

Cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* e *Naegleria* têm sido detectados em fontes de água no mundo todo e a presença dessas amebas num veículo como este representa um risco eminente para a saúde humana. Por este motivo, é de fundamental importância que se tome conhecimento de medidas preventivas para evitar que haja a contaminação com esses patógenos.

O uso da água é algo comum na vida de todos os seres vivos, e garantir a qualidade dela, principalmente quando for manejada por indivíduos imunocomprometidos, é de extrema importância, seja para uso corriqueiro, como banhos e lavagens de olhos e região nasal, como para fins recreativos (piscinas públicas, lagos, etc.), além do grande alerta que esta revisão levanta, que é a utilização da água em meio hospitalar e da regulamentação para controle e prevenção da contaminação de pacientes e funcionários que permeiam em suas dependências.

Já que, como referenciado por Costa (2010), a maioria dos relatórios realizados para detectar amebas de vida livre em hospitais e unidades de saúde avaliou áreas úmidas ou sistemas de abastecimento de água e destacou o papel das amebas como possível hospedeiro de bactérias patogênicas, sendo esta relação endossimbiótica com outros micro-organismos uma

possível fonte de disseminação para diversas outras patógenos e suas respectivas doenças.

A conscientização pública também é um ponto importante a ser destacado, já que os riscos relacionados a estas amebas acabam sendo negligenciado, aumentando significativamente as chances de contaminação, principalmente em países subdesenvolvidos. É interessante que se use como meio preventivo, campanhas em ambientes como hospitais, escolas, locais de recreação em que se use algum meio como a água, principalmente por meios como mídia e cartazes informativos.

Como o EAG causado por *Acanthamoeba spp.* ocorre em hospedeiros com funções imunes enfraquecidas, nenhum método claramente definido existe para a prevenção da infecção por essas amebas (VISVEVARA *et al.*, 2007). Como a disseminação deste patógeno é por via nasal (assim como a *Naegleria fowleri*), e pode ser tanto por contato com água contaminada ou poeira que contenha seus cistos ou trofozoítos, o contato com a terra e água de lagos, piscinas, etc, deve ser cauteloso.

No caso da ceratite por *Acanthamoeba*, como as lentes de contato e soluções de cuidados são fatores de risco bem conhecidos, educar os usuários quanto ao cuidado adequado das lentes de contato é importante para a prevenção da infecção. Além disso, os usuários de lentes devem ser instruídos a não usar lentes de contato durante a natação (VISVEVARA *et al.*, 2007).

A *Naegleria* é uma ameba termofílica, que se prolifera em água não tratada com cloro nos meses mais quentes do ano. Portanto, é uma questão de urgência em manter o nível de cloro na água, como todos os casos de PAM estão relacionados ao uso inadequado de água clorada para natação, práticas de ablução e enxágüe nasal usando netipots.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cloro livre com concentração residual igual ou superior a 0,5 mg/L, o pH inferior a 8,0 e a temperatura à 20°C, após um tempo de contato de pelo menos 30 minutos é efetivo para a distribuição de cloro. Existem certas ações pessoais que podem ser úteis para reduzir o risco de PAM, como o uso de água doce não tratada ou da torneira deve ser evitada, uso de água destilada, estéril e filtrada (utilização de filtro com poros absolutos iguais ou inferiores a 1µm) para enxaguar, lavar

ou irrigar as passagens nasais ou para tornar solução de irrigação e uso de água previamente fervida (JAHANGEER *et al.*, 2019).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo permitiu a realização de um levantamento em acervos acerca das características patogênicas das AVLS, em destaque a *Acanthamoeba spp.* e a *Naegleria fowleri*, importância e relação com o ambiente hospitalar, características destes agentes na natureza e doenças correlacionadas a estes microrganismos e suas repercussões.

Apesar de não haverem casos relatados diretamente relacionados à AVL em ambiente hospitalar no Brasil, esta é uma possibilidade que não deve ser negligenciada, tendo em vista que algumas das infecções causadas são geralmente fatais, não sendo detectadas em tempo de início da terapia medicamentosa e outros métodos de intervenção, para controle e eliminação do agente etiológico.

De extrema importância que cada Comissão de Infecção Hospitalar (CCIH) direcionem esforços para implantar protocolos voltados a higiene e desinfecção e combate de agentes como as AVLs, sobretudo em épocas mais quentes do ano e naqueles ambientes onde prevalecem a formação de biofilmes, fatores que podem culminar em maiores ocorrências.

6. REFERÊNCIAS

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

ALVES, P.R. Identificação de amebas de vida livre em poeira de ar condicionado da unidade de terapia intensiva pediátrica de um hospital escola do interior do Rio Grande do Sul. **Trabalho de conclusão de curso**. Univ. Santa Cruz do Sul, SC; 2016.

ALVES, D.S.M.M. Avanços no isolamento e caracterização biológica e molecular de *Acanthamoebaspp*(*Acanthamoebidae*) – Ameba de vida livre:

Determinação Experimental do potencial patogênico. **Tese de doutorado**. Prog. Pós-grad. Ciênc. Saúd. Univ. de Brasília. 2012.

ANAISSIE EJ, PENZAK SR, DIGNANI M. O suprimento de água do hospital como fonte de infecções nosocomiais: um apelo à ação. **Arch Intern Med** 162:1483 e 1492, 2002.

ANZIL AP, RAO C, WRZOLEK MA, VISVEVARA GS, SHER JH, KOZLOWSKI PB. Amebic meningoencephalitis in a patient with AIDS caused by a newly recognized opportunistic pathogen. **Arch Pathol Lab Med** v. 115, p. 21–25, 1991.

ARANCE-GIL, Á.; GUTIÉRREZ-ORTEGA, Á. R.; VILLA-COLLAR, C.; NIETO-BONA, A.; LOPES-FERREIRA, D.; GONZÁLEZ-MÉIJOME, J. M. Corneal cross-linking for *Acanthamoeba keratitis* in an orthokeratology patient after swimming in contaminated water. **Contact Lens and Anterior Eye**, v. 37, n. 3, p. 224–227, 2014.

BAKARDJIEV, A., AZIMI, P. H., ASHOURI, N., ASCHER, D. P., JANNER, D., SCHUSTER, F. L., ... GLASER, C.. Amebic encephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris*: report of four cases. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 22, n. 5, p. 447–452, 2003.

BARATA, R. de C. B. O desafio das doenças emergentes e a revalorização da epidemiologia descritiva. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 531–537, 1997.

BELLINI, N. K., SANTOS, T. M., DA SILVA, M. T. A., & THIEMANN, O. H. The therapeutic strategies against *Naegleria fowleri*. **Experimental Parasitology**, v. 187, p. 1–11, 2018.

BERGER, P., PAPAIZIAN, L., DRANCOURT, M., LA SCOLA, B., AUFFREY, J.-P., & RAOULT, D. Ameba-associated Microorganisms and Diagnosis of Nosocomial Pneumonia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 248–255, 2006.

BIL INSKI P, HOLOWNIA P, PARAFINSKA K, TOMASZEWSKI W, KAPKA-SKRZYPCZAK L. Gerenciando a segurança da água na área da saúde. Parte 1 e Estratégias e abordagens para o controle de patógenos na água. **AnnAgric Environ Med**; 19:395 e 402, 2012.

BRIGHT, K. R., & GERBA, C. P. Review: Occurrence of the pathogenic amoeba *Naegleria fowleri* in groundwater. **Hydrogeology Journal**, v. 25, n. 4, p. 953–958, 2017.

BRUCKNER, D.; GARCIA, L.S. Diagnostic Medical Parasitology. 2. Ed. Washington, **American society for Microbiology**, 1993.

CASTRILLÓN, J. C., & OROZCO, L. P. *Acanthamoeba spp.* como parásitos patógenos y oportunistas. **Revista Chilena de Infectología**, v. 30, n. 2, p. 147–155, 2013.

CATEAU, E., DELAFONT, V., HECHARD, Y., & RODIER, M. H. Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections. **Journal of Hospital Infection**, v. 87, n. 3, p. 131–140, 2014.

CARLESSO, A. M. Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes de hospital público da cidade de Porto Alegre, RS. **Dissertação de mestrado**. Facul. Agron. Univ. Rio Grande do Sul, 2006.

CARLESSO, A. M., SIMONETTI, A. B., ARTUSO, G. L., & ROTT, M. B. Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes de hospital público da cidade de Porto Alegre, RS. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 316–320, 2007.

COHEN EJ, PARLATO CJ, ARENTSEN JJ, GENVERT GI, EAGLE RC Jr, WIELAND MR, LAIBSON PR. Medical and surgical treatment of *Acanthamoeba* keratitis. **American Journal of Ophthalmology**, v. 103, n. 5, p. 615–625, 1987.

CLARKE, D. W., & NIEDERKORN, J. Y. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 175–180, 2006.

DART JK, SAW VP, KILVINGTON S. *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis and treatment update. **American Journal of Ophthalmology**, v. 148, n. 4, p. 487–499, 2009.

DE JONCKHEERE JF. Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboid flagellate *Naegleria fowleri*. **Infect Genet Evol.**;11:1520-1528, 2011.

DE JONCKHEERE, J. F., GRYSEELS, S., & EDDYANI, M. Knowledge of morphology is still required when identifying new amoeba isolates by molecular techniques. **European Journal of Protistology**, v. 48, n. 3, p. 178–184, 2012.

FERREIRA, M. E. C. S. C. Meningoencefalites infecciosas causadas por amebas de vida livre: *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* e *Acanthamoeba spp.* **Trabalho de conclusão de curso**. Centro Universitário de Brasília – UNICEUB, Brasília, Distrito Federal, 2019.

GARNER, J. S., JARVIS, W. R., EMORI, T. G., HORAN, T. C., & HUGHES, J. M. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. **American Journal of Infection Control**, v. 16, n. 3, p. 128–140, 1988.

GUPTA, N., BHASKAR, H., DUGGAL, S., GHALAUT, P. S., KUNDRA, S., & ARORA, D. R. Primary amoebic meningoencephalitis: first reported case from Rohtak, North India. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 3, p. 236–237, 2009.

GARCIA, A., GOÑI, P., CIELOSZYK, J., FERNANDEZ, M. T., CALVO-BEGUERÍA, L., RUBIO, E., ...CLAVEL, A. Identification of Free-Living Amoebae and Amoeba-Associated Bacteria from Reservoirs and Water Treatment Plants by Molecular Techniques. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 7, p. 3132–3140, 2013.

GREUB, G., & RAOULT, D. Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 413–433, 2004.

HALLAM, N. ., WEST, J. ., FORSTER, C. ., & SIMMS, J. The potential for biofilm growth in water distribution systems. **Water Research**, v. 35, n. 17, p. 4063–4071, 2001.

HALEY, R. W., CULVER, D. H., WHITE, J. W., MORGAN, W. M., EMORI, T. G., MUNN, V. P., & HOOTON, T. M. The efficacy of infection surveillance and control programs in preventing nosocomial infections in US hospitals. **American Journal of Epidemiology**, v. 121, n. 2, p. 182–205, 1985.

HOFFMANN, R., & MICHEL, R. Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 203, n. 3, p. 215–219, 2001.

HOTEZ, P. J. Human Parasitology and Parasitic Diseases: Heading Towards 2050. **Advances in Parasitology**, p. 29–38, 2018

IBRAHIM, Y. W., BOASE, D. L., & CREE, I. A. Factors Affecting the Epidemiology of *Acanthamoeba* Keratitis. **Ophthalmic Epidemiology**, v. 14, n. 2, p. 53–60, 2007.

JENKINS, D. R. Nosocomial infections and infection control. **Medicine**, v. 45, n. 10, p. 629–633, 2017.

JOHN, D. T. Primary Amebic Meningoencephalitis and the Biology of *NaegleriaFowleri*. **Annual Review of Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 101–123, 1982.

JOSLIN, C. E., TU, E. Y., MCMAHON, T. T., PASSARO, D. J., STAYNER, L. T., & SUGAR, J. Epidemiological Characteristics of a Chicago-area *Acanthamoeba* Keratitis Outbreak. **American Journal of Ophthalmology**, v. 142, n. 2, p. 212–217 e 2, 2006.

KHAN, H. A., BAIG, F. K., & MEHBOOB, R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 5, p. 478–482, 2017.

KHAN, N. A. Pathogenicity, Morphology, and Differentiation of *Acanthamoeba*. **Current Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 391–395, 2001.

KHAN, N. A., JARROLL, E. L., & PAGET, T. A. Molecular and Physiological Differentiation Between Pathogenic and Nonpathogenic *Acanthamoeba*. **Current Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 197–202, 2002.

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

KULSOOM, H., BAIG, A. M., SIDDIQUI, R., & KHAN, N. A. Combined drug therapy in the management of granulomatous amoebic encephalitis due to *Acanthamoeba* spp., and *Balamuthia mandrillaris*. **Experimental Parasitology**, v. 145, S115–S120, 2014.

LAFFERTY, K. D. Environmental parasitology: What can parasites tell us about human impacts on the environment? **Parasitology Today**, v. 13, n. 7, p. 251–255, 1997.

LASJERDI, Z., NIYYATI, M., HAGHIGHI, A., SHAHABI, S., BIDEROUNI, F. T., TAGHIPOUR, N., ... NAZEMALHOSSEINI MOJARAD, E. Potentially pathogenic free-living amoebae isolated from hospital wards with immunodeficient patients in Tehran, Iran. **Parasitology Research**, v. 109, n. 3, p. 575–580, 2011.

LASJERDI, Z., NIYYATI, M., LORENZO-MORALES, J., HAGHIGHI, A., & TAGHIPOUR, N. Ophthalmology hospital wards contamination to pathogenic free living Amoebae in Iran. **Acta Parasitologica**, v. 60, n. 3, 2015.

LAU, H. L., DE LIMA CORVINO, D. F., GUERRA, F. M., MALIK, A. M., LICHTENBERGER, P. N., GULTEKIN, S. H., ... GONZALES ZAMORA, J. A. Granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* in a patient with AIDS: a challenging diagnosis. **Acta Clinica Belgica**, 1–5, 2019.

LINDER, J. W.-K., EWERT. Free-living Amoebae Protecting *Legionella* in Water: The Tip of an Iceberg? **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 31, n. 4, p. 383–385, 1999.

LIM N, GOH D, BUNCE C, XING W, FRAENKEL G, POOLE TR, FICKER L. Comparison of polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine as monotherapy agents in the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. **American Journal of Ophthalmology**, 145, 130–135, 2008.

LLINGWORTH, C.D. & COOK, S.S. *Acanthamoeba* keratitis. **Surv. Ophthalmol.** v. 42, n. 6, p. 493-508, 1998.

LORENZO-MORALES, J., KHAN, N. A., & WALOCHNIK, J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite**, 22, 10, 2015.

LORENZO-MORALES J, MARTÍN-NAVARRO CM, LÓPEZ-ARENCIBIA A, ARNALICH-MONTIEL F, PIÑERO JE, VALLADARES B. *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 4, p. 181–187, 2013.

LOVIENO, A., LEDEE, D. R., MILLER, D., & ALFONSO, E. C. (2010). Detection of Bacterial Endosymbionts in Clinical *Acanthamoeba* Isolates. **Ophthalmology**, v. 117, n. 3, p. 445–452.e3, 2010.

MA, P., VISVEVARA, G. S., MARTINEZ, A. J., THEODORE, F. H., DAGGETT, P.-M., & SAWYER, T. K. Naegleria and *Acanthamoeba* Infections: Review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 490–513, 1990.

MAFFRAND, R., PIZZI, R., PÁEZ REARTE, M., TOMAS, A., MAFFRAND, C., & PIZZI, H. L. Queratitis por *Acanthamoeba*. Infección ocular emergente? Reporte de casos. **Revista de Salud Pública**, v. 23, n. 1, p. 41, 2019.

MARCIANO-CABRAL, F. Free-Living Amoebae as Agents of Human Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 8, p. 1104–1106, 2009.

MARTÍNEZ, A. J., GUERRA, A. E., GARCÍA-TAMAYO, J., CÉSPEDES, G., GONZÁLEZ-ALFONSO, J. E., & VISVEVARA, G. S. Granulomatous amebic encephalitis: a review and report of a spontaneous case from Venezuela. **Acta Neuropathologica**, v. 87, n. 4, p. 430–434, 1994.

MOLMERET, M., HORN, M., WAGNER, M., SANTIC, M., & ABU KWAIK, Y. Amoebae as Training Grounds for Intracellular Bacterial Pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 20–28, 2005.

MOURA, H. de, SALAZAR, H. C., FERNANDES, O., LISBOA, D. C., & CARVALHO, F. G. de. Amebas de vida livre no intestino humano: evidências de parasitismo. **Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 27, n. 3, p. 150–156, 1985.

MUCHESA, P., BARNARD, T. G., & BARTIE, C. The prevalence of free-living amoebae in a South African hospital water distribution system. **South African Journal of Science**, v. 111, n. 1/2, p. 1–3, 2015.

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

PARMAR, D. N., AWWAD, S. T., PETROLL, W. M., BOWMAN, R. W., MCCULLEY, J. P., & CAVANAGH, H. D. Tandem Scanning Confocal Corneal Microscopy in the Diagnosis of Suspected Acanthamoeba Keratitis. **Ophthalmology**, v. 113, n. 4, p. 538–547, 2006.

PIÑERO, J. E., CHÁVEZ-MUNGUÍA, B., OMAÑA-MOLINA, M., & LORENZO-MORALES, J. *Naegleria fowleri*. **Trends in Parasitology**, 2019.

POLATZA, WALOCHNIK, J, OBWALLER A, VURAL A, DURSUN A, ARICI MK. Miltefosine and polyhexamethylene biguanide: a new drug combination for the treatment of Acanthamoeba keratitis. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 42, n. 2, p. 151–158, 2014.

POR, Y. M., MEHTA, J. S., CHUA, J. L. L., KOH, T.-H., KHOR, W. B., FONG, A. C. Y., ... TAN, D. T. H. Acanthamoeba Keratitis Associated with Contact Lens Wear in Singapore. **American Journal of Ophthalmology**, v. 148, n. 1, p. 7–12 e2, 2009.

RAMOS, R.T.; MOURA, H. & SALAZAR, H.C. Isolamento de amebas de vida livre de água mineral. In: **Congresso Brasileiro de Parasitologia**, 5º, Rio de Janeiro. *Resumos*. Rio de Janeiro, 1980. p. 60, 1980.

RIDWANE MUNGROO, M., KHAN, N. A., & SIDDIQUI, R. *Naegleria fowleri*: diagnosis, treatment options and pathogenesis. Expert Opinion on Orphan Drugs, 2019.

SCHEID, P., & SCHWARZENBERGER, R. Acanthamoeba spp. as vehicle and reservoir of adenoviruses. **Parasitology Research**, v. 111, n. 1, p. 479–485, 2012.

SCHMIDT, R. A. C. A questão ambiental na promoção da saúde: uma oportunidade de ação multiprofissional sobre doenças emergentes. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 17, n. 2, p. 373–392, 2007.

SCHUSTER, F. L. Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 3, p. 342–354, 2002.

SCHUSTER, F. L., HONARMAND, S., VISVEVARA, G. S., & GLASER, C. A. Detection of Antibodies against Free-Living Amoebae *Balamuthia mandrillaris* and *Acanthamoeba* Species in a Population of Patients with Encephalitis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 9, p. 1260–1265, 2006.

SCHUSTER FL, VISVEVARA GS. Opportunistic amoebae: Challenges in prophylaxis and treatment. **Drug Resist Updat**. 7:41-51, 2014.

SCHUSTER, F. L., &VISVESVARA, G. S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **Internationa Journal for Parasitology**, v. 34, n. 9, p. 1001–1027, 2004.

SHAKEEL S, IFFAT W, KHAN M. Pharmacy students' knowledge assessment of *Naegleria fowleri* infection. **Scientifica**; 2:16-22, 2016.

SIDDIQUI, R., ALI, I. K. M., COPE, J. R., & KHAN, N. A. Biology and pathogenesis of *Naegleria fowleri*. **Acta Tropica**, v. 164, p. 375–394, 2016.

SILVA, M.A. Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de poeira de hospitais da cidade de Presidente Prudente – SP. **Dissertação de mestrado**. Facul. Ciênc. Farmac. Univ. Est. São Paulo, 2001.

SILVA, M.A.; ROSA J. A. Isolamento de ameba de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. **Rev. SaúdePúbl.**, v. 37, n. 2, p. 242-46, 2003.

SOARES, S. S., SOUZA, T. K., BERTÉ, F. K., CANTARELLI, V. V., & ROTT, M. B. Occurrence of Infected Free-Living Amoebae in Cooling Towers of Southern Brazil. **Current Microbiology**, v. 74, n. 12, p. 1461–1468, 2017.

SZENASI, Z., ENDO, T., YAGITA, K., &NAGY, E. Isolation, Identification and Increasing Importance of “Free-Living” Amoebae Causing Human Disease. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 5–16, 1998.

SZENTMÁRY, N., DAAS, L., SHI, L., LAURIK, K. L., LEPPER, S., MILIOTI, G., & SEITZ, B. Acanthamoeba keratitis – Clinical signs, differential diagnosis and treatment. **Journal of Current Ophthalmology**, 2018.

THEWES, S., SOLDATI, T., & EICHINGER, L. Editorial: Amoebae as Host Models to Study the Interaction With Pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, n. 9, 2019.

THOMAS, V.; MCDONNELL, G.; DENYER, SP; MAILLARD, J.-Y. Amebas de vida livre e sua patogenicidade intracelular microrganismos: riscos para a qualidade da água. **FEMS Microbiol. Rev.**, 34, 231-259, 2010.

THOMAS, V., HERRERA-HIMAN, K., BLANC, D. S., & GREUB, G. Biodiversity of Amoebae and Amoeba-Resisting Bacteria in a Hospital Water Network. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2428–2438, 2006.

TORNO, M. S., BABAPOUR, R., GUREVITCH, A., & WITT, M. D. Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 42, n. 2, p. 351–354, 2000.

TRABELSI, H.; DENDANA, F.; SELLAMI, A.; SELLAMI, H.; CHEIKHROUHO, F.; NEJI, S.; AYADI, A. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. **Pathologie Biologie**, v. 60, n. 6, p. 399–405, 2012.

TRABELSI, H., DENDANA, F., NEJI, S., SELLAMI, H., CHEIKHROUHO, F., MAKNI, F., & AYADI, A. Morphological and molecular identification of free living amoeba isolated from hospital water in Tunisia. **Parasitology Research**, v. 115, n. 1, p. 431–435, 2015.

TROFIMOV, V., KICKA, S., MUCARIA, S., HANNA, N., RAMON-OLAYO, F., DEL PERAL, L. V.-G., ... SOLDATI, T. Antimycobacterial drug discovery using Mycobacteria-infected amoebae identifies anti-infectives and new molecular targets. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

TU, E. Y., JOSLIN, C. E., NIJM, L. M., FEDER, R. S., JAIN, S., & SHOFF, M. E. Polymicrobial Keratitis: Acanthamoeba and Infectious Crystalline Keratopathy. **American Journal of Ophthalmology**, v. 148, n. 1, p. 13–19 e 2, 2009.

UEKI N, EGUCHI H, OOGI Y, SHIOTA H, YAMANE S, UMAZUME H, MIZUI K. Three cases of Acanthamoeba keratitis diagnosed and treated in the early stage. **Journal of Medical Investigation**, v. 56, n. 3–4, p. 166–169, 2009.

VISVESVARA, G. S., & STEHR-GREEN, J. K. Epidemiology of Free-Living Ameba Infections. **The Journal of Protozoology**, v. 37, n. 4, p. 25s–33s, 1990.

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

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

WINIECKA-KRUSNELL, J., & LINDER, E. Bacterial infections of free-living amoebae. **Research in Microbiology**, v. 152, n. 7, p. 613–619, 2001.

ZANELLA, J.F.P. *Acanthamoeba* spp. Em ambientes hospitalares e acadêmicos do Rio Grande do Sul, Brasil. **Tese de doutorado**. Prog. Pós-grad. Biotc. Univ. Caxias do Sul, 2011.

ZYSERMAN, I., MONDAL, D., SARABIA, F., MCKERROW, J. H., ROUSH, W. R., & DEBNATH, A. Identification of cysteine protease inhibitors as new drug leads against *Naegleria fowleri*. **Experimental Parasitology**, v. 188, p. 36–41, 2018.