

Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais

Isolation of potentially pathogenic free-living amoebas in hospital dust

Maria Aparecida da Silva^a e João Aristeu da Rosa^b

^aFaculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade do Oeste Paulista. Presidente Prudente, SP, Brasil. ^bDepartamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista. Araraquara, SP, Brasil

Descritores

Acanthamoeba, isolamento. *Naegleria*, isolamento. Hospitais. Amoeba. Poeira, análise. Infecção hospitalar, prevenção. *Naegleria*. Amebas de vida livre.

Keywords

Acanthamoeba, isolation. Purification. *Naegleria*, isolation. Purification, hospitals. Amoeba. Dust, analysis. Cross infection. Prevention control. *Naegleria*. Free-living amoebas.

Resumo

Objetivo

Observar a ocorrência de amebas de vida livre dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria* em amostras de poeira coletadas em hospitais.

Métodos

Foram coletadas 132 amostras de poeira em dois hospitais do município de Presidente Prudente, São Paulo. Os locais da coleta foram: Unidade de Terapia Intensiva, Centro Cirúrgico, Isolamento de Moléstias Infecciosas, Berçário, Emergência e Cozinha. As amostras foram semeadas em três meios de cultura: meio de ágar não nutriente com *Escherichia coli*, meio de ágar infusão de soja e microcultivo em meio de Pavlova modificado por Giuzzi. As amebas isoladas foram identificadas segundo critérios morfológicos.

Resultados

O índice geral de positividade para amebas de vida livre, potencialmente patogênicas, dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*, foi de 45,5%, sendo positivas 41,6% das amostras de poeira coletadas no hospital universitário e 50% no hospital estadual. Obtiveram-se 45,5% de positividade do gênero *Acanthamoeba* e 3,8% para amebas do gênero *Naegleria*.

Conclusões

As amebas de vida livre, potencialmente patogênicas, estavam presentes em todos os ambientes estudados dos dois hospitais, sendo que as espécies do gênero *Acanthamoeba* foram as isoladas com maior frequência.

Abstract

Objective

To evaluate the occurrence of free-living amoebas of the genera *Acanthamoeba* and *Naegleria* in dust samples collected in two hospitals.

Methods

One-hundred and thirty-two dust samples were collected in two hospitals in Brazil. Hospital collection sites were the following: intensive care unit, operation rooms, nursery, kitchen, emergency and infectious diseases isolation room. The isolation of the amoebas was performed in three culture media: non-nutrient agar inoculated with *Escherichia coli*, soy agar, and microculture in Giuzzi-modified Pavlova's medium. The amoebas were identified according to morphological criteria.

Correspondência para/ Correspondence to:
Maria Aparecida da Silva
Av. Paulo Marcondes, 649, Bloco 3, Apto 202
19025-000 Presidente Prudente, SP, Brasil
E-mail: silmap@muranet.com.br

Baseado na dissertação de mestrado apresentada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara, em 2001.
Recebido em 21/6/2002. Reapresentado em 16/12/2002. Aprovado em 20/12/2002.

Results

Amoebas of the genera Acanthamoeba and Naegleria were found in 45.5% of the samples, of which 41.6% were collected in the university hospital and 50% in the state hospital. Of all, 45.5% were positive for the genera Acanthamoeba and 3.8% for genera Naegleria.

Conclusions

Potentially pathogenic free-living amoebas were seen in all sites of the two hospitals and Acanthamoeba was the most frequently isolated genera.

INTRODUÇÃO

As amebas de vida livre constituem um grupo de protozoários de ampla dispersão ambiental, isoladas em praticamente todos os ambientes da água, do solo e do ar. Foram isoladas em todos os continentes, nas mais diversas altitudes. Resistem a extremas condições de temperatura e de pH, bem como ao cloro e a outros sistemas de desinfecção.

Durante muito tempo, o estudo das amebas de vida livre esteve restrito ao campo da zoologia, até que Fowler & Carter,⁸ em 1965, na Austrália, e Butt³ em 1966, nos Estados Unidos, relataram os primeiros casos de meningoencefalite fatal em humanos. Os casos foram atribuídos às amebas de vida livre.

Sabe-se hoje que algumas espécies de amebas de vida livre podem comportar-se como parasitas facultativos de seres humanos e de animais domésticos. Elas podem invadir o sistema nervoso central e outros órgãos, causando morte ou incapacidade permanente.^{9,11}

Atualmente, as espécies de interesse médico são: *Naegleria fowleri*, várias espécies do gênero *Acanthamoeba* e *Balamuthia mandrillaris*. As principais doenças causadas por amebas de vida livre são:

- a) Meningoencefalite amebiana primária - tem como agente etiológico *Naegleria fowleri*. É uma doença de evolução clínica rápida e fatal, que ocorre principalmente em crianças ou jovens saudáveis. A porta de entrada da ameba parece ser a cavidade nasal, por aspiração de água contaminada ou inalação de poeira contendo cistos amebianos. A via de invasão do sistema nervoso central é o epitélio neuro-olfativo.^{6,11}
- b) Encefalite amebiana granulomatosa - é uma doença de curso clínico prolongado, causada por várias espécies de amebas do gênero *Acanthamoeba*. As mais frequentes são *Acanthamoeba polyphaga*, *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba culbertsoni*, *Acanthamoeba rhyssodes*, *Acanthamoeba divionensis*, além da *Balamuthia mandrillaris*.¹³

É considerada uma infecção oportunista, que ocorre principalmente em indivíduos debilitados, alcoólatras, doentes crônicos, pessoas submetidas a tratamento com drogas imunossupressoras e pacientes imunocomprometidos. A porta de entrada da ameba pode tanto ser o trato respiratório quanto úlceras de pele. A via de invasão do sistema nervoso central parece ser a hematogênica, embora possa ocorrer também por meio do epitélio neuro-olfativo.^{6,13} A *Acanthamoeba* pode causar também infecções disseminadas, principalmente em pacientes com Aids ou transplantados.^{1,14,18,20}

- c) Ceratite por *Acanthamoeba* - é uma infecção crônica da córnea, causada por várias espécies de *Acanthamoeba*. As mais isoladas são *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, *Acanthamoeba culbertsoni*, *Acanthamoeba hatchetti*, *Acanthamoeba rhyssodes* e *Acanthamoeba griffini*. A infecção é mais frequente entre usuários de lentes de contato. As lesões oculares ocorrem provavelmente por meio de um microtraumatismo do olho. A contaminação pode ocorrer pela água contaminada ou partículas do ar ou solo contendo cistos amebianos.¹⁹

No Brasil, apesar de já terem sido descritos casos de doença humana, poucos são os relatos da presença de amebas de vida livre no ambiente.^{4,5} Outro aspecto importante é a possibilidade de associação entre algumas espécies de amebas de vida livre e bactérias. Várias espécies de bactérias patogênicas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Legionella* spp, *Listeria monocytogenes*, entre outras, foram observadas no interior de amebas de vida livre.²²

Baseado no fato de que essas e outras bactérias carregadas por amebas de vida livre são importantes causas de infecções hospitalares e também porque algumas espécies de amebas de vida livre podem causar infecções fatais, principalmente em indivíduos debilitados e imunocomprometidos, realizou-se estudo com o objetivo de verificar a ocorrência de amebas de vida livre dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria* em amostras de poeira coletadas em hospitais.

MÉTODOS

Entre os meses de agosto e novembro de 2000, foram feitas doze coletas semanais consecutivas de amostras de poeira de várias áreas de dois hospitais, um universitário e um estadual, da cidade paulista de Presidente Prudente. Foram coletadas 132 amostras de poeira – 72 no hospital universitário e 60 no estadual. De cada um deles, foram coletadas 12 amostras das seguintes áreas: Unidade de Terapia Intensiva (UTI), Centro Cirúrgico (CC), Berçário (B), Cozinha (C) e Emergência (E). No hospital universitário, incluiu-se também a área Isolamento de Moléstias Infecciosas (MI).

Cada amostra de poeira foi coletada com dois *swabs* esterilizados, secos, que foram passados de forma aleatória sobre o piso e o mobiliário dos locais em estudo. Os *swabs* foram colocados em cálices contendo água destilada esterilizada, espremidos e descartados. O material foi deixado para sedimentação por duas horas.

Para o isolamento das amebas foram utilizados três meios de cultura: meio de ágar não nutriente a 1,5%, recoberto com uma suspensão de *Escherichia coli* mortas pelo calor, meio de ágar infusão de soja segundo Foronda⁷ (1979) e microcultivo em meio de Pavlova modificado por Giazzi⁹ (1996).

Foram colocadas no centro de duas placas de Petri três gotas do sedimento de cada cálice de sedimentação: uma contendo o meio de ágar não nutriente e outra o meio de ágar infusão de soja segundo Foronda⁷ (1979). As placas foram colocadas em sacos plásticos para evitar a dessecação e incubadas a 28°C por até 14 dias.

A verificação do crescimento amebiano foi feita diariamente nas duas placas. O desenvolvimento das culturas foi acompanhado colocando-se a placa invertida sobre a platina de um microscópio comum. Para o estudo da morfologia das amebas, adicionou-se pequena quantidade de água destilada esterilizada sobre o crescimento. Uma gota desse líquido foi colocada entre lâmina e lamínula e observada ao microscópio com aumentos lineares de 100 e 400 vezes.

Quanto ao microcultivo em meio de Pavlova,⁹ colocou-se uma gota do sedimento sobre uma lâmina, adicionou-se algumas gotas do meio de cultura e cobriu-se com lamínula. A montagem foi incubada em câmara úmida à temperatura ambiente e examinada diariamente ao microscópio por até 14 dias, quando as amostras negativas foram descartadas.

A identificação das amebas foi feita pela observação de cistos e trofozoítos e baseada no tipo de movimento e nos critérios morfológicos de Page¹⁵ (1976).

As amebas observadas com características morfológicas do gênero *Naegleria* foram submetidas à prova de flagelação para confirmação do gênero. Algumas amebas pertencentes a outros gêneros podem apresentar características morfológicas semelhantes, mas somente espécies de *Naegleria* possuem a capacidade de flagelação dentro das condições do teste.

Para a prova de flagelação, as amebas foram inoculadas no meio onde ocorreu seu isolamento e incubadas a 28°C por 18h a 24h. O crescimento resultante foi coberto com água destilada esterilizada e incubado a 37°C. A leitura foi feita, colocando-se uma gota do líquido entre lâmina e lamínula e observando-se, ao microscópio, o aparecimento de formas flageladas ativamente móveis. Essa leitura foi feita a cada 30 min por quatro horas.^{15,16}

RESULTADOS

Foram isoladas amebas de vida livre potencialmente patogênicas em todos os ambientes estudados nos dois hospitais. As amebas foram identificadas até gênero segundo os critérios morfológicos de Page¹⁵ (1976).

Das 132 amostras de poeira coletadas nos dois hospitais, 60 (45,5%) foram positivas para amebas de vida livre, potencialmente patogênicas, dos gêneros *Acanthamoeba* ou *Naegleria*, e 72 (54,5%) foram negativas.

Das amostras de poeira coletadas, foram obtidos 65 isolados de amebas de vida livre potencialmente patogênicas. Em todas as amostras positivas, foram identificadas espécies como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*, o que corresponde a um percentual de positividade de 45,5%. Espécies identificadas como pertencentes ao gênero *Naegleria* foram identificadas em cinco amostras de poeira, com 3,8% de positividade.

A Tabela mostra o número e a percentagem de amostras positivas e negativas para amebas de vida livre, potencialmente patogênicas, em cada área nos dois hospitais estudados.

No hospital universitário, das 30 amostras positivas, foram observadas espécies de *Acanthamoeba* em 26 (86,6%). Em quatro (13,4%), havia espécies de *Acanthamoeba* e *Naegleria*. No hospital estadual, das 30 amostras positivas, foram identificadas espécies de *Acanthamoeba* em 29 (96,6%), e espécies de *Acanthamoeba* e *Naegleria* em uma (3,4%) amostra.

Foram obtidos isolados de *Acanthamoeba* em to-

das as áreas estudadas, nos dois hospitais. No hospital universitário foram obtidos quatro isolados de *Naegleria*, sendo três em amostras de poeira da Cozinha e um do Centro Cirúrgico. No hospital estadual foi encontrado apenas um isolado de *Naegleria* em uma amostra de poeira do Berçário.

DISCUSSÃO

Amebas de vida livre são ubiqüitárias no ambiente. Espécies de *Naegleria* preferem ambientes aquáticos, natural ou artificialmente aquecidos, e o solo, enquanto espécies de *Acanthamoeba* ocorrem em qualquer ambiente. *Balamuthia mandrillaris*, única espécie desse gênero, responsabilizada por casos de infecção em humanos, ainda não foi isolada do ambiente.^{2,21}

O encontro de amebas patogênicas no meio ambiente constitui somente um indicador da possibilidade de aquisição da parasitose. São pouco conhecidos os fatores que condicionam a ocorrência de infecção e doença. Para Page¹⁵ (1976), é evidente que muitas cepas não são patogênicas, ou muitas pessoas não são vulneráveis, ou circunstâncias especiais são necessárias para que ocorram as alterações patogênicas.

Os relatos sobre o isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas a partir de poeira são escassos. Assim, Kingston & Warhurst,¹⁰ em 1969, isolaram essas amebas da poeira e do ar de um quarto ocupado por crianças acometidas de infecção respiratória.

Giazzi⁹ (1996), estudando a prevalência de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em vários habitats na cidade de Araraquara, São Paulo, coletou 23 amostras de poeira, obtendo um percentual de 86,9% para espécies de *Acanthamoeba*, e de 39,1% para espécies de *Naegleria*.

Os índices obtidos no presente estudo, 45,5% para espécies de *Acanthamoeba* e 3,8% para espécies de *Naegleria*, foram bem menores do que os observados

por Giazzi⁹ (1996), provavelmente porque as amostras de poeira foram coletadas em ambientes hospitalares, onde a circulação de pessoas é menor e também existe um cuidado maior com a limpeza.

Conforme resultados do presente estudo, foram isoladas espécies de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em todos os ambientes estudados, nos dois hospitais, nas diversas áreas (Tabela). É preocupante a ocorrência dessas amebas, já que muitos pacientes internados em hospitais têm sua imunidade deprimida, seja naturalmente, devido a doenças ou a pouca idade ou, artificialmente, pelo uso de drogas imunossupressoras. Outros são submetidos a cirurgias ou podem, ainda, apresentar problemas de queimadura em áreas extensas da pele, o que pode facilitar a implantação de germes oportunistas, entre os quais, espécies de *Acanthamoeba*.

Apesar do número de amostras coletadas ser pequeno, analisando-se os dados da Tabela, observa-se que não há diferenças no número de isolados obtidos na Emergência, nem na Cozinha dos dois hospitais. No Berçário, a diferença observada se dá, provavelmente, pelo fato de que o hospital estadual é um hospital-maternidade, sendo, portanto, relativamente maior o número de pessoas circulando pelo ambiente.

O menor índice de positividade ocorreu no Centro Cirúrgico e na Unidade de Terapia Intensiva nos dois hospitais. Isso, provavelmente, se deve ao fato de que nesses locais, por abrigar pacientes de risco, além da maior preocupação com limpeza e desinfecção, o acesso de pessoas é normalmente restrito a poucos profissionais, que fazem uso de equipamentos de proteção individual, como luvas, máscaras, gorros, protetores de pés e roupas apropriadas e esterilizadas. Esses cuidados poderiam contribuir para a diminuição da contaminação desses ambientes, já que se sabe que espécies de *Acanthamoeba* têm sido isoladas como flora normal das vias aéreas superiores de indivíduos aparentemente saudáveis.¹²

Tabela - Resultado da presença de amebas de vida livre potencialmente patogênicas, em amostras de poeira coletadas nos hospitais estudados, segundo as respectivas áreas de cada hospital.

Áreas	Hospital universitário			Hospital estadual		
	Positiva N (%)	Amostras Negativa N (%)	Total N (%)	Positiva N (%)	Amostras Negativa N (%)	Total N (%)
UTI	3 (25,0)	9 (75,0)	12 (100)	4 (33,3)	8 (66,7)	12 (100)
CC	3 (25,0)	9 (75,0)	12 (100)	5 (41,6)	7 (58,4)	12 (100)
B	5 (41,6)	7 (58,4)	12 (100)	8 (66,7)	4 (33,3)	12 (100)
C	7 (58,4)	5 (41,6)	12 (100)	7 (58,4)	5 (41,6)	12 (100)
E	6 (50,0)	6 (50,0)	12 (100)	6 (50,0)	6 (50,0)	12 (100)
MI	6 (50,0)	6 (50,0)	12 (100)	-	-	-
Total	30 (41,6)	42 (58,4)	72 (100)	30 (50,0)	30 (50,0)	60 (100)

UTI = Unidade de Terapia Intensiva; CC = Centro Cirúrgico; B = Berçário; C = Cozinha; E = Emergência; MI = Isolamento de Moléstias Infecciosas.

O maior número de isolados de espécies do gênero *Naegleria* foi observado na Cozinha do hospital universitário, provavelmente pelo fato de que os cistos de *Naegleria* são pouco resistentes à dessecação, o que explica sua ausência do solo.¹⁷ Esses cistos ocorrem com frequência em lama ou lodo. É facilitada a viabilidade dos cistos dessas amebas na cozinha, que pode permanecer molhada por períodos longos devi-

do ao uso de água para o preparo dos alimentos e lavagem de utensílios.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. João Flávio Giazzi, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, SP, pelas sugestões e pelo auxílio na identificação das amebas.

REFERÊNCIAS

1. Anderlini P, Przepiorka D, Luna M, Langdorf L, Andreeff M, Claxton D, Deisseroth AB. *Acanthamoeba* meningoencephalitis after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1994;14:459-61.
2. Bottone EJ. Free-living amebas of the genera *Acanthamoeba* and *Naegleria*: an overview and basic microbiologic correlates. *Moun Sinai J Med* 1993;60:260-70.
3. Butt CG. Primary amebic meningoencephalitis. *N Engl J Med* 1996;274:1473-6.
4. Campos R, Gomes MCD, Pringenzi LS, Stecca J. Meningoencefalite por ameba de vida livre. Apresentação do primeiro caso latinoamericano. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1977;19:349-51.
5. Chimelli L, Hahm MD, Scaravilli F, Wallace S, Vivesvara GS. Granulomatous amebic meningoencephalitis due to *Leptomyxid*: report of the first Brazilian case. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992;86:635.
6. Fernandez MCA, Crespo EP. Las amebas de vida libre o anfizoica (Protozoa, Lobosea). In: Durán MLS. *Avances en parasitología*. Santiago de Compostela (Espanha): Servicio de Publicaciones de la Universidad de Santiago de Compostela; 1992. p. 143-62.
7. Foronda AS. Observações sobre amebas de vida livre potencialmente patogênicas [Tese de doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da USP; 1979.
8. Fowler M, Carter RF. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp. A preliminary report. *BMJ* 1965;2:740-2.
9. Giazzi JF. Contribuição para o estudo do isolamento, cultivo e manutenção das amebas de vida livre [Tese de livre-docência]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP; 1996.
10. Kingston D, Warhurst DC. Isolation of amoebae from the air. *J Med Microbiol* 1969;2:27-36.
11. Martinez AJ. *Free-living amebas: natural history, prevention, diagnosis, pathology and treatment of the disease*. Boca Raton: CRC Press; 1985.
12. Martinez AJ. Free-living amebas: infection of the central nervous system. *Moun Sinai J Med* 1993;60:271-8.
13. Martinez JM, Guerra AE, Garcia-Tamayo J, Céspedes G, Gonzáles-Alfonzo J, Vivesvara G. Granulomatous amebic encephalitis: a review and report of spontaneous case from Venezuela. *Acta Neuropathol* 1994;87:430-4.
14. Murakawa GJ, McCalmont T, Altman J, Telang GH, Hoffman MD, Kantor GR, Berger TG. Disseminated acanthamebiasis in patients with AIDS. A report of five cases and a review of the literature. *Arch Dermatol* 1995;131:1291-6.
15. Page FC. *An illustrated key to fresh water and soil amoebae*. Cambridge: Freshwater Biological Association; 1976. (Scientific Publication, 34).
16. Salazar HC. Amebas de vida livre no Rio de Janeiro. Isolamento e patogenicidade [Tese de professor-titular] Rio de Janeiro: Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 1985.
17. Singh BN, Das SR. Intra-nasal infection of mice with flagellate stage of *Naegleria* aerobia and its bearing on the epidemiology of human meningo-encephalitis. *Current Sci* 1972;41:625-8.
18. Sison JP, Kemper CA, Loveless M, McShane D, Vivesvara GS, Deresinski SC. Disseminated acanthamoeba infection in patients with AIDS: case reports and review. *Clin Infect Dis* 1995;20:1207-16.
19. Stehr-Green JK, Bailey TM, Vivesvara GS. The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. *Am J Ophthalmol* 1989;107:331-6.
20. Steinberg JP, Galindo RL, Kraus ES, Ghanem KG. Disseminated acanthamebiasis in a renal transplant recipient with osteomyelitis and cutaneous lesions: case report and literature review. *Clin Infect Dis* 2002;35:43-9.
21. Vivesvara GS, Schuster FL, Martinez AJ. *Balamuthia mandrillaris*, N.G., N.Sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J Euk Microbiol* 1993;40:504-14.
22. Walochnik J, Picher O, Aspöck C, Ullmann M, Sommer R, Aspöck H. Interactions of "*Limax amoebae*" and gram-negative bacteria: experimental studies and review of current problems. *Tokai J Exp Clin Med* 1999;23:273-8.