

## Isolamento e caracterização morfológica de *Acanthamoeba* spp em caixas de água de edifícios residenciais

Isolation and morphological characterization of *Acanthamoeba* spp in water tanks of residential buildings

Aislamiento y caracterización morfológica de *Acanthamoeba* spp en tanques de agua de edificios residenciales

Recebido: 05/02/2021 | Revisado: 07/02/2021 | Aceito: 12/02/2021 | Publicado: 19/02/2021

### Victoria Ramírez Orozco

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1351-2211>  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil  
E-mail: victoriaramiritos@hotmail.com

### Noriel Alexis García García

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8418-8503>  
Instituto Distrital de Ciencia y Biotecnología e Innovación en Salud, Colômbia  
E-mail: alexizbac@gmail.co

### Sandra Mónica Estupiñán Torres

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6937-4567>  
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colômbia  
E-mail: sestupinan@unicolmayor.edu.co

### Daniel Leonardo Orozco

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0563-2907>  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil  
E-mail: orozco.dlr@gmail.com

### Gilberto Henrique Teles

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0151-2572>  
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil  
E-mail: gilbertohenriqueteles@gmail.com

### Luci Claudio Cassimiro de Amorim

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6991-5060>  
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil  
E-mail: luci Claudioamorim@hotmail.com

### Ricardo Sérgio da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2900-6807>  
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil  
E-mail: profricardosergio.bio@gmail.com

### Resumo

*Acanthamoeba* spp um dos gêneros que conforma o grupo das amebas de vida livre é o agente causal da ceratite amebiana e encefalite granulomatosa, doenças associadas ao uso das lentes de contato, deficiência na higiene pessoal e exposição a água contaminada. O objetivo desse trabalho foi isolar formas evolutivas de *Acanthamoeba* spp na água de consumo em um condomínio residencial no bairro as Nieves da cidade de Bogotá, Colômbia. Foram coletadas dez amostras no total, a técnica empregada foi a filtração por membrana e o cultivo no meio agar não nutritivo com uma suspensão de *Escherichia coli* para garantir o desenvolvimento da ameba. Como controle positivo foi usada uma cepa de *Acanthamoeba* spp e controle negativo água destilada estéril. As características morfológicas e tamanho das formas evolutivas foram determinadas por microscopia convencional facilitando a classificação nos grupos descritos por Pussard e Pons. De uma amostra foram identificados 5 trofozoítos e 6 cistos correspondentes aos grupos II e III respectivamente, indicando a presença de várias espécies de *Acanthamoeba*. A amostra positiva corresponde a uma caixa que nunca foi feita a limpeza, o que foi confirmado pelo administrador do condomínio, infringindo com as normativas de saneamento das caixas de água para consumo. Concluindo que as más condições sanitárias favorecem o desenvolvimento dessa ameba e faz-se necessária a identificação das espécies junto com o genótipo para correlacionar a capacidade infecciosa.

**Palavras-chave:** Ameba de vida livre; Caixa de água; Ceratite amebiana; Encefalite granulomatosa.

### Abstract

*Acanthamoeba* spp, one of the genera that make up the group of free-living amoebae, is the causative agent of amoebic keratitis and granulomatous encephalitis, diseases associated with the use of contact lenses, deficiency in

personal hygiene and exposure to contaminated water. The objective of this work was to isolate evolutionary forms of *Acanthamoeba* spp in drinking water in a residential condominium in the Nieves neighborhood in the city of Bogotá, Colombia. Ten samples were collected in total, the technique employed was membrane filtration and cultivation on non-nutritive agar medium with a suspension of *Escherichia coli* to ensure the development of the amoeba. As a positive control, a strain of *Acanthamoeba* spp was used and a negative control was used for sterile distilled water. The morphological characteristics and size of the evolutionary forms were determined by conventional microscopy, facilitating the classification in the groups described by Pussard and Pons. From a sample, 5 trophozoites and 6 cysts corresponding to groups II and III respectively were identified, indicating the presence of several species of *Acanthamoeba*. The positive sample corresponds to a tank that has never been cleaned, which was confirmed by the condominium administrator, in violation of the sanitation regulations for drinking water tanks. Concluding that the bad sanitary conditions favor the development of this amoeba and it is necessary to identify the species together with the genotype to correlate the infectious capacity.

**Keywords:** Amoebic keratitis; Free-living amoeba; Granulomatous encephalitis; Water storage.

### Resumen

*Acanthamoeba* spp, uno de los géneros que componen el grupo de las amebas de vida libre, es el agente causal de queratitis amebiana y encefalitis granulomatosa, enfermedades asociadas al uso de lentes de contacto, deficiencia en la higiene personal y exposición a agua contaminada. El objetivo de este trabajo fue aislar formas evolutivas de *Acanthamoeba* spp en agua potable en un condominio residencial en el barrio Las Nieves de Bogotá, Colombia. Se recolectaron diez muestras en total, la técnica empleada fue la filtración por membrana y el cultivo en medio agar no nutritivo con una suspensión de *Escherichia coli* para garantizar el desarrollo de la ameba. Como control positivo se utilizó una cepa de *Acanthamoeba* spp y como control negativo agua destilada estéril. Las características y el tamaño de las formas evolutivas se determinaron mediante microscopía convencional, facilitando la clasificación en los grupos descritos por Pussard y Pons. De una muestra se identificaron 5 trofozoítos y 6 quistes correspondientes a los grupos II y III respectivamente, lo que indica la presencia de varias especies de *Acanthamoeba*. La muestra positiva corresponde a un tanque que nunca fue limpiado, siendo confirmado por el administrador del condominio, incumpliendo con la normativa de saneamiento para tanques de agua potable. Concluyendo que las malas condiciones sanitarias favorecen el desarrollo de esta ameba y es necesario identificar la especie junto con el genotipo para correlacionar la capacidad infecciosa.

**Palabras clave:** Ameba de vida libre; Encefalitis granulomatosa; Queratitis amebiana; Tanques domiciliarios.

## 1. Introdução

*Acanthamoeba* spp é o gênero mais prevalente implicado em infecções humanas, conformado por protozoários do grupo das chamadas Amebas de Vida Livre (AVL), é isolada de diferentes fontes aquáticas, assim como de poeira, ar, solo e lentes de contato, também tem sido isolada como contaminantes de meios de cultura de bactérias e fungos. Tem ampla distribuição mundial, além de apresentar alta resistência à dessecação, temperaturas extremas e desinfetantes (Jeong & Yu, 2005; Secretaria Distrital de Planeación, 2011). Esse gênero foi descrito pela primeira vez por Douglas Castellani em 1930, como um microrganismo saprofítico que cresce em meios de cultura de levedura e que pode se tornar patógeno humano (Scheid & Schwarzenberger, 2011).

Desde 1930 *Acanthamoeba* spp é atribuída como agente etiológico de ceratite em pacientes imunocompetentes e Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) em pacientes imunocomprometidos (Hoffmann & Rolf, 2001), posteriormente, descobriu-se que elas podem transportar bactérias no interior da sua estrutura e atuar como vetores de microrganismos (Dupuy et al., 2011). Partindo desse fato, as normativas ambientais da Colômbia incluem eliminar a presença de microrganismos na água doméstica, então o não cumprimento da normativa ou simplesmente a desinformação por parte da comunidade que mora na Unidade de Planejamento Zonal (UPZ) Las Nieves com respeito à limpeza, desinfecção e controle de caixas de armazenamento para consumo humano descritos no Decreto 1575 de 2007 aumenta a possibilidade de contaminação dessas amebas na água para consumo humano, devido a que se tem comprovado que as AVL são eliminadas na sua totalidade pelos processos de purificação, além a contaminação da água por esses protozoários é causada pelo armazenamento desse recurso em caixas sem controle regular de lavagem (Muchesa et al., 2014).

Este estudo determinou a presença de *Acanthamoeba* spp nas caixas de armazenamento de água para consumo humano em diferentes propriedades horizontais da UPZ Las Nieves, esse protozoário foi isolado por meio de técnicas

padronizadas e os isolamentos realizados foram caracterizados morfológicamente. O intuito foi promover a conscientização sob a limpeza e desinfecção dessas caixas. Poucos estudos têm sido realizados com o mesmo propósito, por isso é importante contribuir com a pesquisa para determinar a presença de *Acanthamoeba* spp na água para consumo humano, devido a que o número de casos notificados desde 1960 (primeiro caso) até o ano 2000, foi aproximadamente 200 casos de indivíduos com EAG, e mais de 3.000 indivíduos com Ceratite Amebiana, sendo esta última a principal causa de infecção pelo uso inadequado de lentes de contato em mulheres e trauma da córnea em homens com mais de 50 anos (Martínez, 1991).

As amebas apresentam duas formas evolutivas no seu ciclo de vida, que são, trofozoíto e cisto. Os cistos estão dispersos no meio ambiente e quando as condições ambientais são ótimas reverterem à forma vegetativa ou trofozoíto (Dupuy et al., 2011) e estes são replicados por mitose. Os cistos e trofozoítos desenvolveram mecanismos de entrada nos humanos, as quais são pelos olhos causando ceratite severa, trato respiratório superior e inferior, e através da pele lesada invadindo o sistema nervoso central por disseminação hematogênica causando EAG (Khan, 2006).

Além a *Acanthamoeba* spp se comporta como um veículo transportando diferentes vírus e bactérias como *Legionella* spp, *Pseudomonas* spp, *Helicobacter* spp, *Mycobacterium* spp, *Vibrio* spp, *Listeria* spp, *Burkholderia* spp, e oocistos de *Cryptosporidium* spp. O trofozoíto se alimenta de bactérias, algas, leveduras e partículas orgânicas ambientais através da emissão de pseudópodes e posterior fagocitose (acredita-se que na córnea elas se alimentem de ceratócitos) (Dupuy et al., 2011; Gregório, 2020). Esta ameba possui uma variedade de fontes alimentares graças à sua capacidade de sintetizar enzimas como a alginato-liases, que permite acesso às bactérias por meio da matriz extracelular e da enzima polihidroxibutirato despolimerase (PHA) presente no interior da bactéria (Martínez, 1991; Honorato et al., 2020; Almeida et al., 2020).

Seguido da estrutura enzimática, a membrana plasmática do trofozoíto está composta por 33% de proteínas, 25% de fosfolipídios, 13% de esteróis e 29% de lipofosfoglicanos, substâncias que em conjunto favorecem sua mobilidade. A parede do cisto contém 33% de proteínas, 4% de lipídios, 35% de carboidratos (principalmente celulose), 8% de cinzas e 20% de materiais não identificados. O fato de conter menor porcentagem de lipídios e maior porcentagem de carboidratos em sua estrutura confere-lhe a morfologia característica permitindo-lhe resistir a mudanças ambientais extremas ou estressantes (Lovieno et al., 2010), além disso, a enzima trealose-6 fosfato sintase permite adaptar se a ambientes que induzem estresse (Martínez, 1991). As proteínas de choque térmico HSP 60 e HSP 70 estão associadas ao mecanismo de resistência às altas temperaturas. Essas proteínas são chaperonas e são responsáveis pelo dobramento de novas proteínas no retículo endoplasmático, regenerando estruturas alteradas pela mudança de temperatura, elas aumentam em qualquer situação em que a homeostase é perdida ajudando a preservar ou degradar proteínas desnaturadas (Kilvington et al., 2004).

Das doenças que pode desenvolver essa ameba, descreve-se a encefalite amebiana como a inflamação do cérebro que causa várias manifestações clínicas, como lesões no crânio, torcicolo e seps. Os sintomas podem aparecer semanas, meses e, em alguns casos, até anos após a exposição. Começa com dor de cabeça, dores musculares, febre, dor de garganta, vômitos, confusão, tontura, sonolência, aumento da pressão intracraniana, e a morte ocorre semanas ou meses após o início dos sintomas (Jeong & Sun, 2005). E a ceratite é a inflamação da córnea, associada ao uso de lentes de contato, falta de higiene pessoal e exposição a água contaminada; causando dor nos olhos, sensação de corpo estranho, infiltrado anular e diminuição da acuidade visual (Jeong & Sun, 2005).

As caixas de armazenamento de água doméstica cumprem a função de fornecer o recurso hídrico em quantidade suficiente 24 horas por dia para a comunidade. Esta água não deve ser portadora de patógenos e produtos químicos que podem ser tóxicos para o consumo humano (Decreto 1575 de 2007), a normativa indica que os prestadores do serviço de água se comprometeram a desinfetar as caixas públicas e os usuários das residências ficaram responsáveis da limpeza e desinfecção das caixas domésticas pelo menos a cada seis meses (Resolución 2115 de 2007).

Dentro das normas, o Decreto 1575 de 2007 descreve que os usuários são informados sobre a lavagem das caixas domésticas e orienta sob a proteção e o controle da qualidade da água, a fim de monitorar, prevenir e controlar os riscos à saúde humana causados pelo seu consumo (Decreto 1575 de 2007), Nesse decreto se encontra o capítulo III da Responsabilidade pelo controle e vigilância para garantir a qualidade da água para consumo humano, no ARTIGO 10 que enfoca a Responsabilidade dos usuários (Resolución 2115 de 2007) para o estado sanitário das caixas domésticas, é estabelecido que:

*“Cada usuário é responsável por manter em condições sanitárias adequadas as instalações de distribuição e armazenamento de água para consumo humano no âmbito intra-domiciliar”* (Resolución 2115 de 2007)

Nesse capítulo é indicada a frequência com que as caixas devem ser lavadas e desinfetadas, além disso se encontra um Parágrafo do artigo 10 em que se indica que as autoridades sanitárias e ambientais devem se responsabilizar por suas campanhas de educação em saúde e meio ambiente para divulgar amplamente à população as obrigações que têm como usuários, bem como as diretrizes de preservação da qualidade da água para consumo humano (Resolución 2115 de 2007), neste sentido as UPZ facilitam a organização e comunicação com a comunidade, a UPZ, é uma subdivisão zonal na cidade de Bogotá- Colômbia, agrupa vários bairros com características similares com o intuito de definir e delimitar o planejamento do solo urbano, além de aplicar as normativas da cidade e acrescentar a participação da cidadania.

## 2. Metodologia

Este estudo é de tipo qualitativo o qual permitiu determinar a presença de *Acanthamoeba* spp em nas caixas de água (Pereira et al., 2018) Os edifícios deste estudo foram selecionados aleatoriamente segundo a base de dados fornecida pela Prefeitura do bairro Santafé. Foram verificadas as propriedades horizontais que se encontram dentro dos limites da UPZ Las Nieves (Figura 1) e que também possuíssem caixas residenciais, tal verificação é realizada através de chamadas telefônicas em que o administrador de cada propriedade confirma as condições para o estudo e seu consentimento para a amostragem.

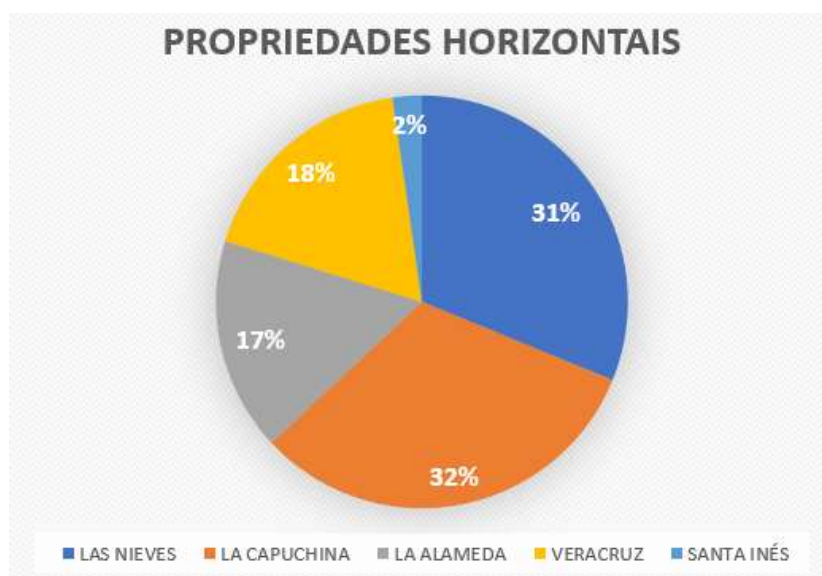
**Figura 1.** Localização UPZ Las Nieves na cidade Bogotá, Colômbia.



Fonte: Alcaldía Mayor de Bogotá. (Adaptado).

O número da amostra foi calculado com o número de imóveis horizontais em cada bairro com o intuito que as amostras para o estudo sejam equitativas, a seguir se apresenta o número de amostras coletadas: Las Nieves: 3, La Capuchina: 3, La Alameda: 2, Veracruz: 1, Santa Inés: 1 (Gráfico 1).

**Gráfico 1.** Propriedades horizontais por bairros.



O gráfico expressa as porcentagens das propriedades horizontais que conformam cada bairro. Fonte: Autores.

As amostras foram coletadas com o protocolo fornecido pelo professor Dr. Sixto Raúl Costamagna, membro do grupo de Parasitología Clínica da Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. A seguir descreve-se a metodologia: as amostras de água foram coletadas em garrafas de vidro estéreis, e submergidas sob o nível de água de caixa doméstica. Após a coleta das amostras (100 ul) foram levadas ao laboratório e deixadas em repouso entre 18 e 24 horas a 21°C. Após esse período, é utilizada a filtração por membrana, que é um método de concentração em que amostra passa por um filtro (Kilvington et al., 2004), essa membrana de 0,45 mm é tomada com uma pinça voltada para cima no meio da cultura que contém ágar não nutritivo (Castrillón & Orozco, 2013) contendo um filme de suspensão (500ul) de *Escherichia coli*. Foram usados dois controles, em que o controle positivo foi uma cepa de *Acanthamoeba* spp fornecida pelo professor Dr. Sixto Raul Costamagna e o controle negativo foi água destilada estéril.

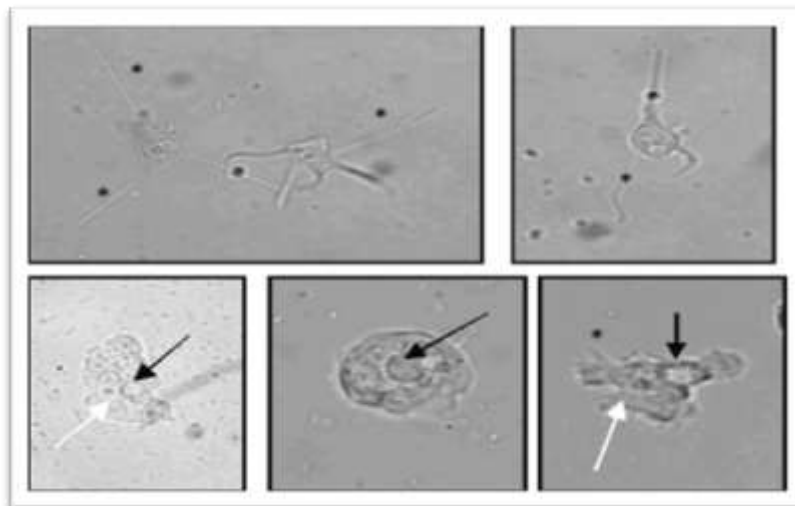
Os meios de cultura foram incubados a 22°C. Após 48 horas de incubação, foi feita a primeira observação para evidenciar o crescimento, para isso, a superfície do ágar foi raspada com uma alça bacteriológica, o material extraído é misturado em uma gota de água destilada estéril sobre uma lâmina e observado em microscópio de luz; primeiro, em 10X e em seguida, as estruturas suspeitas são confirmadas em 40X.

A cultura é considerada positiva quando são observados trofozoítos e / ou cistos morfológicamente compatíveis com AVL. Quando o resultado é negativo, a observação é repetida diariamente por 7 dias. Se a cultura ainda for negativa após 15 dias de incubação, ela é descartada e registrada como negativa para o isolamento de AVL. Nas amostras positivas é realizado o estudo morfológico e morfométrico das cepas isoladas. A formação de acantópodos, pseudópodos e as características do núcleo em trofozoítos isolados devem ser registradas. A confirmação das espécies é realizada por metodologias moleculares, mas neste estudo não foi possível realizar.

Para a identificação microscópica das amebas, é necessário observar suas características morfológicas específicas (Figura 2) No trofozoíto destacam-se em sua superfície projeções citoplasmáticas espinhosas, chamadas acantópodos que lhe conferem movimento unidirecional lento, sua morfologia é irregular, possui um núcleo com nucléolo central esférico e refringente e vacúolos de exclusão de água para a regulação osmótica (Kilvington et al., 2004). Os trofozoítos são a forma infectante, com capacidade para dividir-se. Os cistos representam o elemento de resistência e disseminação, e são

caracterizados por apresentarem uma parede dupla, endo e ectocisto, circundando uma estrutura estrelada ou poliédrica (Scheid & Schwarzenberger, 2011).

**Figura 2.** Trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.

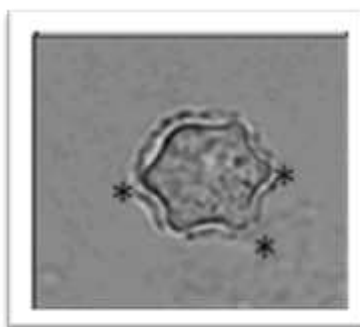


Em fresco 40X. Asterisco (\*) acantópodos, setas pretas: vacúolos de exclusão de água, setas brancas: núcleo. Fonte: Scheid & Schwarzenberger (2011).

Pussard e Pons classificaram as espécies de *Acanthamoeba* spp em três grupos de acordo com o tamanho e as características morfológicas de seus cistos, embora os grupos II e III sejam os mais frequentemente isolados em infecções humanas.

O grupo I é caracterizado por grandes cistos (> 18  $\mu\text{m}$ ) com endocisto estrelado e ectocisto esférico. Ele forma projeções em forma de braço (Figura 3). Algumas espécies pertencentes a este grupo são: *A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata* e *A. tubiashi* (Scheid & Schwarzenberger, 2011).

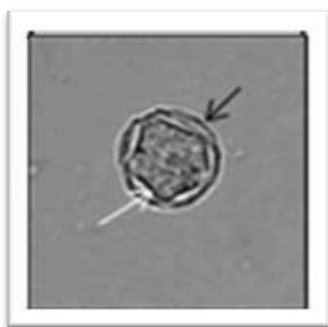
**Figura 3.** Cistos de *Acanthamoeba* spp Grupo I.



Em fresco 40X. Grupo I. Asterisco (\*) Braços. Fonte: Montalbano et al. (2015).

O Grupo II é caracterizado por cistos menores (<18  $\mu\text{m}$ ), endocisto poligonal e ectocisto enrugado (Figura 4). Algumas espécies que pertencem a este grupo: *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. rhyodes*, *A. mauritaniensis*, *A. divionensis*, *A. griffini*, *A. lugdunensis*, *A. quina*, *A. hatchetti*, e *A. triangularis* (Scheid & Schwarzenberger, 2011).

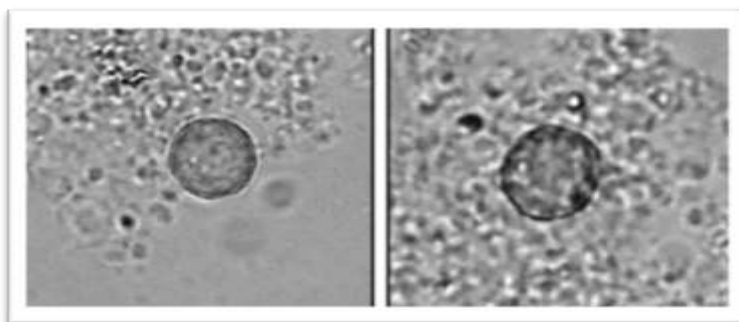
**Figura 4.** Cistos de *Acanthamoeba* spp Grupo II.



Em fresco 40X. Grupo II. seta preta: ectocisto; seta branca: endocisto. Fonte: Montalbano et al. (2015).

O grupo III representa cistos pequenos (<18  $\mu\text{m}$ ), endocisto redondo ou levemente angular e ectocisto levemente enrugado (Figura 5). Algumas espécies que pertencem a este grupo são: *A. culbertsoni*, *A. lenticulata*, *A. palestinensis*, *A. pustulosa*, e *A. royreba* (Scheid & Schwarzenberger, 2011).

**Figura 5.** Cistos de *Acanthamoeba* spp Grupo III.



Em fresco 40X. Grupo III. Fonte: Montalbano et al. (2015).

### 3. Resultados

Foram visitadas 10 propriedades horizontais que possuíam caixa de armazenamento e cada uma foi amostrada, totalizando 10 amostras, das quais 1 foi positiva para *Acanthamoeba* spp (Tabela 1).

**Tabela 1.** Relação dos bairros deste estudo e o número das amostras coletadas.

BAIRRO	PROPRIEDADES HORIZONTAIS	% PROPRIEDADES REGISTRADAS	NÚMERO DE AMOSTRAS	AMOSTRAS POSITIVAS
LAS NIEVES	54	10.9	3	1
LA CAPUCHINA	55	11.13	3	0
LA ALAMEDA	29	5.87	2	0
VERACRUZ	31	6.27	1	0
SANTA INÉS	4	0.80	1	0
<b>TOTAL</b>	<b>173</b>	<b>34.97</b>	<b>10</b>	<b>1</b>

As porcentagens foram calculadas partindo do número total de propriedades que conformam o bairro Las Nieves da cidade de Bogotá, Colômbia. Fonte: Autores.

Com base nas características morfológicas e morfométricas, foi possível identificar 5 trofozoítos e 6 cistos correspondentes aos grupos II e III de acordo com a classificação de Pussard e Pons (Figura 6). A Tabela 2 lista o número de cistos isolados, seu diâmetro e classificação de acordo com o grupo morfológico.

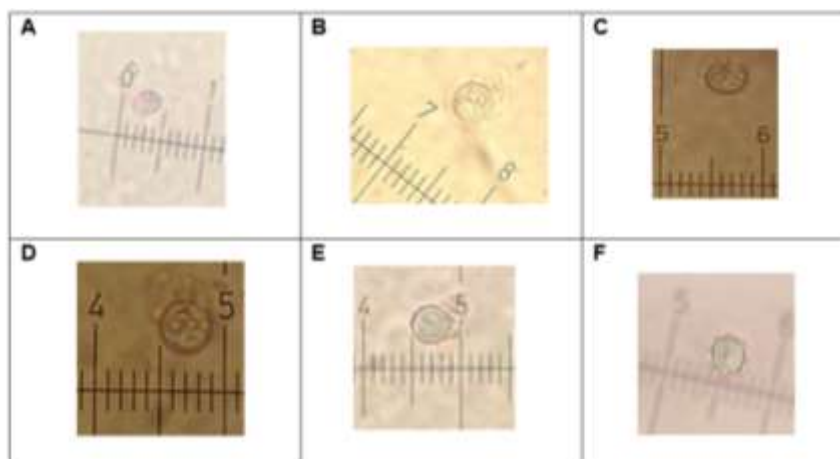
**Tabela 2.** Características dos cistos isolados.

MORFOLOGIA	GRUPO	DIÂMETRO	QUANTIDADE
CISTO	II	14 – 16 $\mu\text{m}$	2
CISTO	III	18 $\mu\text{m}$	4

Classificação em grupos dos cistos isolados. Fonte: Autores.

A amostra positiva corresponde a uma caixa de armazenamento cuja lavagem e desinfecção nunca foram realizadas conforme informado pelo administrador do prédio (Gráfico 2). A seguir a Figura 6 mostra os cistos de *Acanthamoeba* spp. na observação direta.

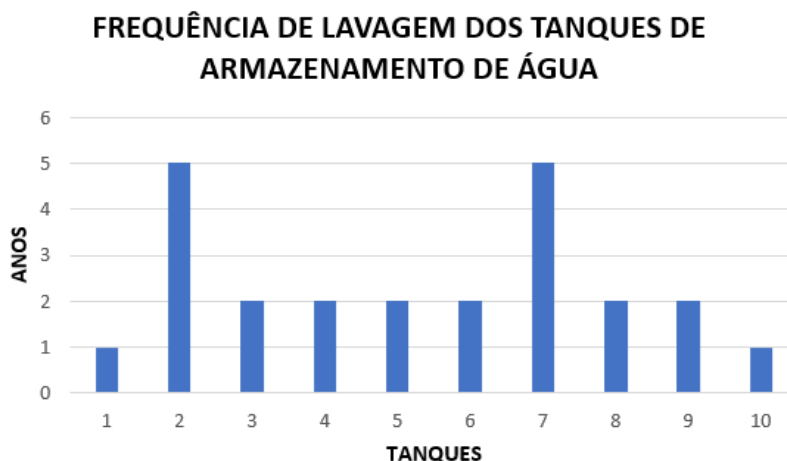
**Figura 6.** Cistos compatíveis com *Acanthamoeba* spp.



Observação 40X. a) e f) Grupo II, b), c), d) e e) Grupo III. Fonte: Autores.




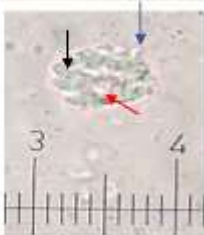

**Gráfico 2.** Limpeza e desinfecção das caixas de armazenamento de água.





O gráfico expressa a frequência de lavagem das caixas de armazenamento de água nas propriedades horizontais deste estudo, na qual as caixas 2 e 7 representam o 20% e realizam limpeza a cada 5 anos, as caixas 1 e 10 (20%) realizam a limpeza uma vez ao ano, e as caixas 3, 4, 5, 6, 8, e 9 (60%) a cada dois anos. Fonte: Autores.

A Tabela 3 mostra os Trofozoítos compatíveis com *Acanthamoeba* spp e uma breve descrição de suas características.

**Tabela 3.** Características dos trofozoítos isolados.

MORFOLOGIA TROFOZOÍTO	FORMAÇÃO DE ACANTOPODOS	CARACTERÍSTICAS DO NÚCLEO	PRESENÇA DO VACUOLO
<p>A</p> 	SIM	Núcleo redondo, excêntrico com nucléolo central proeminente	SIM
<p>B</p> 	SIM	Núcleo redondo, excêntrico com nucléolo central, proeminente e excêntrico	SIM
<p>C</p> 	SIM	Núcleo redondo, excêntrico com nucléolo central	SIM

	SIM	Núcleo redondo, excêntrico com nucléolo central	SIM
	SIM	Núcleo redondo, excêntrico com nucléolo central proeminente	SIM

Observação 40X. Seta preta: núcleo, seta vermelha: vacúolo de exclusão da água, seta azul: formação dos acantópodos. Fonte: Autores.

A temperatura que permitiu o desenvolvimento das amebas identificadas foi a temperatura ambiente 22°C. Para estabelecer a possível patogenicidade das amebas isoladas, foi realizado o teste de termo tolerância, que consiste na subcultura a 37°C na qual nenhum crescimento amebiano foi evidenciado após 15 dias de incubação.

De acordo com relatórios elaborados com os gestores das propriedades horizontais, 100% das caixas amostradas não possuem controle de limpeza e desinfecção conforme estipulado no Decreto 1575/07, 20% afirmam que não realizaram mais limpeza de 5 anos, 60% realizam limpeza pelo menos uma vez a cada 2 anos e 20% realizam limpeza uma vez por ano (Gráfico 2). Quanto às condições físicas, 50% não possuem tampa, 20% são impermeabilizados, nenhum possui filtro de água, todos estão dentro a parte mais alta da propriedade horizontal com exceção de duas caixas que estão localizados no primeiro andar e nenhum deles afirma ter realizado controle microbiológico na água para consumo humano, o que indica que há uma elevada probabilidade no desenvolvimento do ambiente propício ao crescimento de *Acanthamoeba* spp. Recomenda-se aos administradores que façam o controle da limpeza e desinfecção adequada das caixas de armazenamento pelo menos duas vezes ao ano e implementem medidas físicas para que as caixas atendam aos requisitos estruturais exigidos pelo Decreto 1575/07.

#### 4. Discussão

Neste trabalho foi realizado o isolamento de *Acanthamoeba* spp em uma amostra de água de caixas de armazenamento, conforme relatado por Kelvington et al., 2004, a condição higiênica e sanitária das caixas de armazenamento pode favorecer o crescimento dessa ameba já que estas são quase totalmente eliminadas nos processos de purificação (Thomas et al., 2010), no estudo realizado na Coreia por Jeong HJ e Sun YH, 2005 foi relatado presença de amebas na água da torneira que era fornecida por uma caixa de armazenamento, mas não da água da estação de tratamento, sugerindo que as caixas poderiam ser a principal fonte de contaminação de *Acanthamoeba* spp na água para consumo humano (Muchesa et al., 2014). Os cistos isolados pertencem aos grupos II e III em que são observadas diferenças morfológicas entre cistos do mesmo isolamento (Hoffmann & Rolf, 2001; Walochnik et al., 2004; Jeong & Yu, 2005).

Os cistos que pertencem ao grupo II é o mais frequentemente isolado no meio ambiente e em amostras clínicas, sendo este o de maior identificação (Herrawy et al., 2013), indicando um possível papel patogênico uma vez que os estudos realizados por Da Silva & Da Rosa, 2003 mostram que as cepas oportunistas deste grupo morfológico de *Acanthamoeba* spp pertencem aos genótipos patogênicos (Rohr et al., 1998) que são T1, T3, T4, T11, T12 e T14 causando encefalite e ceratite, o genótipo T4 é isolado com mais frequência quando seu tropismo é a córnea, Walochnik et al., 2004 relataram que 10 de 13

cepas de *Acanthamoeba* spp pertencem a esse genótipo (Gianinazzi et al., 2009), Lovieno et al., 2010 relataram que 90% das ceratites amebianas são causadas por esse genótipo.

O grupo III é o menos frequente, sendo causa de encefalite e ceratite, mas com menor incidência que o grupo II, constitui 5 espécies de *Acanthamoeba* spp das quais são relatadas que três delas não são clinicamente representativas (Niyiyati et al., 2013). Os genótipos associados ao grupo III são T2, T5, T6, T10, T12, T14 e T15, que também causam encefalite e ceratite (Kilvington et al., 2004).

O crescimento da *Acanthamoeba* spp a 37°C facilita seu comportamento como potencial patógeno, uma vez que demonstra capacidade de crescimento à temperatura corporal humana (Walochnik et al., 2004). No entanto, os cistos obtidos neste estudo foram cultivados novamente a 37°C e nenhum crescimento foi obtido deles, o que está relacionado à sua baixa patogenicidade para humanos conforme relatado por Gianinazzi et al., 2009 em que as temperaturas abaixo de 30°C permitem crescimento de amebas não patogênicas e acima de 35°C são identificados como a causa das complicações amebianas (encefalite e ceratite) (Stothard et al., 1998). Um estudo realizado por Lares-Jiménez & Lares-Villa, 2009 em águas superficiais mostrou que AVL que cresciam em temperaturas acima de 37°C, tinham a capacidade de crescer também a 20°C, o que as torna termotolerantes e não termofílicas (Da Silva & Da Rosa, 2003) por meio de processos de encistamento e / ou desencaxe, os diferentes autores o consideraram um fator determinante de patogenicidade (Walochnik et al., 2000), mas outros afirmam que não haveria relação possível entre temperatura e patogenicidade de amebas devido à sua estrutura e seus diferentes genótipos. (Nuprasert et al., 2010; Siddiqui & Khan, 2012; Davila, 2014).

Os cistos de *Acanthamoeba* spp podem atingir as caixas de armazenamento pelo ar (Montalbano et al., 2015), pela água de armazenada por muito tempo (Khan et al., 2001; Jiménez & Villa, 2009) ou ser transportados por operadores (Alves et al., 2012). Todas essas fontes são de difícil controle, portanto, pesquisar a presença de *Acanthamoeba* spp e determinar as espécies presentes é relevante para a toma de medidas profiláticas que reduzam os riscos de contaminação da água para consumo humano.

## 5. Considerações Finais

Foi determinada a presença de *Acanthamoeba* spp na água de uma caixa doméstica dos edifícios residenciais da UPZ Las Nieves, utilizando técnicas padronizadas. Os isolados obtidos foram caracterizados morfolologicamente e correspondem aos grupos II e III de acordo com a classificação de Pussard e Pons. Os isolados não são termotolerantes, o que sugere que as amebas não são patogênicas. Recomenda-se a identificação dos gêneros de *Acanthamoeba* spp por meio de técnicas moleculares para que se possa estabelecer seu genótipo e sua relação com a capacidade infectante de amebas isoladas, o que permitirá ampliar linhas de pesquisa para a caracterização molecular e fisiológica dos isolados e finalmente recomenda-se aos administradores das propriedades horizontais que segundo os lineamentos do Decreto 1575/07 seja feito a limpeza e desinfecção das caixas de água no tempo especificado, além de fazer adequações das mesmas para evitar futura contaminação.

Os autores deste estudo sugerem que em estudos futuros sejam determinadas as espécies de *Acanthamoeba* mais prevalentes no ambiente, além recomendase realizar estudos de tipo quantitativo com a finalidade de obter uma melhor interpretação dos achados e compreender a historia natural das doenças causadas por espécies desta ameba.

## Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## Referências

- Alcaldía Mayor de Bogotá. (2012). Plan parcial de renovación urbana. “Estación central”. Programa multifase de Revitalización del centro de Bogotá.
- Almeida, R. L. J., Santos, N. C., Pereira, T. dos S., Silva, V. M. de alcântara, Ribeiro, V. H. de A., Silva, L. R. I., Muniz, C. E. de S., Moreira, F. I. N., Pinheiro, W. S., & Eduardo, R. S. (2020). Physical-chemical and microbiological analysis of water reservoirs for industrial supply. *Research, Society and Development*, 9(4), e07942795.
- Alves, D de S., Moraes, A., Nitz, N., de Oliveira, M., Hecht, M., Gurgel-Gonçalves, R., & Cuba, C. (2012). Occurrence and characterization of Acanthamoeba similar to genotypes T4, T5, and T2/T6 isolated from environmental sources in Brasília, Federal District, Brazil. *Experimental Parasitology*. (131): 239-244.
- Castrillón, J., & Orozco, L. (2013). Acanthamoeba spp. Como parásitos patógenos y oportunistas. *Revista Chilena de Infectología*. (30):147-155.
- Da Silva, M., & da Rosa, J. (2003). Isolation of potentially pathogenic free-living amoebas in hospital dust. *Revista de Saud Pública*. (37): 242-246.
- Decreto 1575 de 2007 del Ministerio de la Protección Social. Por el cual se establece el sistema para la protección y control de calidad del agua para consumo humano. 09 de mayo de 2007: 3-4.
- Dupuy, M., Mazoua, S., Berne, F., Bodet, C., Garrec, N., Herbelin, P., Ménard-Szcebara, F., Oberti, S., Rodier, M-H., Soreau, S., Wallet, F., & Héchard, Y. (2011). Efficiency of water disinfectants against Legionella pneumophila and Acanthamoeba. *Water Research*. (45):1087-1094.
- Gianinazzi, C., Schild, M., Zumkehr, B., Wüthrich, F., Nüesch, I., Ryter, R., Schürch, N., Gottstein, B., & Müller, N. (2009). Screening of Swiss hot Spring Resorts for Potentially Pathogenic free-living Amoebae. *Experimental Parasitology*. (126): 45-53.
- Gregório, M. G., Brito, A. N. dos S. L. de, Oliveira, A. G. de, Paiva, F. J. S., & Mascarenhas, N. M. H. (2020). Microbiological quality of water from artesian wells located in the City of Acari, Rio Grande do Norte. *Research, Society and Development*, 9(8), e264985251. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5251>
- Herrawy A, Bahgat M, Mohammed A, Ashour A, Hikal W. (2013). Morpho-Physiological and Biochemical Criteria of Acanthamoeba spp Isolated from Egyptian Aquatic Environment. *Iranian Journal Parasitology*. (8):302 – 312.
- Hoffmann R, Rolf M. (2001). Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. (203): 215-219.
- Honorato, A. L. L., Gomes, J. G. F., Silva, M. do A., & Oliveira, G. A. L. de. (2020). Microbiological analysis of water distributed in the Municipality of Piri-piri - PI, from the Caldeirão weir and artesian wells. *Research, Society and Development*, 9(8), e895986318.
- Jeong, H., & Yu, H. (2005). The role of domestic tap water in Acanthamoeba contamination in contact lens storage cases in Korea. *The Korean Journal of Parasitology*. (43): 47- 50.
- Khan, N. A., Jarroll, E. L., & Paget, T. A. (2001). Acanthamoeba can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assay. *Current Microbiology*. (43): 204-208.
- Khan, N. A. (2006). Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Review*. (30): 564-595.
- Kilvington, S., Gray, T., Dart, J., Morlet, N., Beeching, J., Frazer, D., & Matheson, M. (2004). Acanthamoeba Keratitis: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. *Association for Research in Vision and Ophthalmology*. (45): 165-169.
- Lares-Jiménez, L. F., y F., & Lares-Villa. (2009). Aislamiento de amebas de vida libre en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* (5):159-165.
- Lovieno, A., Ledee, D., Miller, D., & Alfonso, E. (2010). Detection of Bacterial Endosymbionts In Clinical Acanthamoeba Isolates. *Ophthalmology*. (117): 445-452.
- Martínez, A. (1991). Infection of the central nervous system due to Acanthamoeba. *Reviews of Infectious Diseases*. 399-402.
- Montalbanco, M., Filippo, D., Santoro, M., Lovreglio, P., Monno, R., Capolongo, C., Calia, C., Fumarola, L., D’Alfonso, R., Berrilli, F., & Di Cave, D. (2015). Isolation and molecular characterization of free living amoebae from different water sources in Italy. *International Journal Environment Research Public Health*. (12): 3417-3427.
- Muchesa, P., Mwamba, O., Barnard, G., & Bartie, C. (2014). Detection of free-living amoebae using amoebal enrichment in a wastewater treatment plant of Gauteng province South Africa. *BioMed Research International*. 575-297.
- Niyiyati, M., Abedkhosteh, H., Salehi, M., Farmia, S., & Rezaeian, M. (2013). Cultivation and Pathogenic Assays of Acanthamoeba Strains Using Physical Parameters. *Iranian Journal Parasitology*. (8): 186-189.
- Nuprasert, W., Putaporntip, C., Pariyakanok, L., & Jongwutiwes, S. (2010). Identification of a novel T17 genotype of Acanthamoeba from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. *Journal Clinical Microbiology*. (48):4636-4640.
- Pereira, A. S. et al. (2018). Metodologia da pesquisa científica. UFSM.
- Resolución 2115 de 2007 del Ministerio de la Protección Social, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema del control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. 22 de junio 2007. 1-6.
- Rohr, U., Weber, S., Michel, R., Selenka, F., & Wilhelm, M. (1998). Comparison of Free-Living Amoebae in Hot Water Systems of Hospitals with Isolates from Moist Sanitary Areas by Identifying Genera and Determining Temperature Tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*. (64): 1822-1824.

- Scheid, P., & Schwarzenberger, R. (2011). Free-living amoebae as vectors of Cryptosporidia. *Parasitology Research*. (109):499–504.
- Secretaria Distrital de Planeación. Diagnóstico de los aspectos físicos, demográficos y socioeconómicos de la localidad de Santafé (2011). Bogotá,19.
- Siddiqui, R., & Khan, N. (2012). Biology and pathogenesis of Acanthamoeba. *Parasites and Vectors*. 5:6.
- Stothard, D. R., Schroeder-Diedrich, J. M., Awwad, M. H., Gast, R. J., Ledee, D. R., Rodriguez-Zaragosa S, et al. (1998). The evolutionary history of the genus Acanthamoeba and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *Journal Eukaryotic Microbiology*. (45): 45-54.
- Thomas, V., McDonnell, G., Denyer, S. P., & Maillard, J-Y. (2010). Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: Risks for water quality. *FEMS Microbiology Reviews*. (34):231–259.
- Walochnik, J., Sommer, K., Obwaller, E., Haller-Schober, M., & Aspöck, H. (2004). Characterization and differentiation of pathogenic and non-pathogenic Acanthamoeba strains by their protein and antigen profiles. *Parasitology Research*. (92):289-298.