

**UNIVERSIDADE DE SANTA CRUZ DO SUL
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA E FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA**

**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**

Paulo Roberto Alves

Santa Cruz do Sul
2016

Paulo Roberto Alves

**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 apresentado no
Curso de Farmácia, na disciplina de Trabalho de
Curso II, na Universidade de Santa Cruz do Sul
para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Me. Danielly Joani Bullé

Santa Cruz do Sul
2016

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e a minha irmã, que sempre acreditaram na minha capacidade e nunca questionaram minhas escolhas, sem eles não seria possível estar dando este importante passo na minha vida. A eles o meu eterno agradecimento.

À minha amada filha, pelos vários momentos em que tive que deixar de estar presente nas suas brincadeiras ou a ajudando em algo que a mim cabia, para conseguir terminar minhas tarefas necessárias para minha formação acadêmica. Ela com certeza foi minha inspiração em muitos momentos durante toda essa jornada.

À minha amiga, professora e orientadora Danielly Bullé, uma pessoa batalhadora, há quem muito admiro, com sua positividade e perseverança, sempre com sua paciência e disponibilidade para me ajudar no que fosse necessário para a realização desse trabalho, bem como nas aulas curriculares. Manifesto ainda minha profunda gratidão por ter me mostrado esse caminho, e ter me dado uma nova visão do que realmente significa a graduação. Sem teus ensinamentos, a realização desse trabalho não seria possível.

A minha querida colega Helena Jacobs, que juntamente com minha orientadora esteve presente durante boa parte da realização deste trabalho. Sua contribuição foi de grande importância.

Ao grupo dos Feras, de maneira especial, pelos muitos anos que fizeram parte da minha vida, proporcionando momentos que ficarão eternizados na minha memória. Com certeza sentirei saudades da “zuera”, da companhia, da amizade e da lealdade.

E por fim, a todos aqueles, que de uma forma ou de outra contribuíram para que este trabalho fosse concluído e para que eu chegasse aonde cheguei. O meu muito obrigado.

RESUMO

Amebas de Vida Livre representam agentes que podem ser potenciais para infecções em humanos e podem ser encontrados nos mais variados habitats, como poeira, ar atmosférico, água, rios e lagos. O gênero *Acanthamoeba* spp. possui várias espécies com esse potencial patogênico, que podem provocar graves doenças, como a Ceratite Amebiana e a Meningoencefalite Amebiana Primária. As Amebas de Vida Livre podem permanecer viáveis por vários anos em todos os tipos de ambientes, inclusive hospitalares, sendo capazes de ocasionarem vários tipos de infecções, esperando apenas o momento oportuno para realizarem a lise e proliferação. O objetivo deste trabalho foi identificar a presença de amebas de vida livre na poeira de ar condicionado unidade de Terapia Intensiva Pediátrica do Hospital Santa Cruz (HSC), de Santa Cruz do Sul, RS, e classificar sugestivamente as amostras quanto ao seu gênero e potencial patogênico. A cultura monoxênica das amostras foi realizada com ágar não nutriente recobertas com suspensão de *Escherichia coli* inativadas pelo calor e incubadas por 10 dias com verificação diária de crescimento amebiano e observação em microscópio, e então foi realizado o repique e clonagem das amebas. A identificação dos gêneros foi realizada por meio de características morfológicas, seguindo os critérios de PAGE (1988). Testes de termotolerância apresentaram 60% de crescimento a 37°C e 22% a 42°C. Destas amostras, 18% são consideradas altamente patogênicas, pois apresentaram crescimento em ambas as temperaturas. Testes de osmotolerância foram realizados para verificar o potencial patogênico das amebas de vida livre presentes em cada amostra e houve crescimento de 44% na concentração de 0,5M de manitol. Este foi um estudo pioneiro nesse hospital, com a finalidade de apresentar as espécies de amebas de vida livre presentes nas amostras de ar condicionado da Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica, e o seu potencial patogênico para seres humanos. A identificação sugestiva do gênero das amebas foi possível, bem como a classificação quanto ao seu grau patogênico.

Palavras-chave: amebas de vida livre; *Acanthamoeba*; termotolerância; osmotolerância.

ABSTRACT

Free-living amoebae represent potential agents that may be for infections in humans and can be found in various habitats, such as dust, atmospheric air, water, rivers and lakes. The genus *Acanthamoeba* spp. It has several species with this pathogenic potential, which can cause serious diseases such as keratitis Amebic and meningoencephalitis Amebic Primary. The Free-living amoebae can remain viable for several years in all types of environments, including hospitals, being capable of occasioning various kinds of infections, just waiting for the right moment to perform lysis and proliferation. The objective of this study was to identify the presence of amoebas of free life in dust air conditioning unit Pediatric Intensive Care Hospital Santa Cruz (HSC), Santa Cruz do Sul, RS, and sort suggestively samples as to their gender and potential pathogenic. The monoxênica culture samples was performed with non-nutrient agar coated with a suspension of *Escherichia coli* heat inactivated and incubated for 10 days with daily amebic growth verification and observation under a microscope, and then subculture was performed and cloning of amoebae. The identification of the genera was performed by morphological characteristics, the following criteria PAGE (1988). thermotolerance tests showed 60% growth at 37 and 22% at 42 ° C. Of these samples, 18% are considered to be highly pathogenic, it grew at both temperatures. osmotolerância tests were performed to check the pathogenic potential of free-living amoebae present in each sample and there was growth of 44% at a concentration of 0.5 M mannitol. This was a pioneering study in this hospital, in order to present the species of free-living amoebae present in air conditioning samples of Pediatric Intensive Care Unit, and its pathogenic potential for humans. The suggestive identification of amoebae genre was possible, and the classification as to its pathogenic degree.

Keywords: free-living amoebae; *Acanthamoeba*; thermotolerance; osmotolerância.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 (A) Cisto de <i>Acanthamoeba</i> spp. observado com microscopia eletrônica	
Figura 1 (B) cisto de <i>Acanthamoeba</i> spp. observado com microscópio óptico.	166
Figura 2 (A) Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> spp. observado por microscopia eletrônica. Figura 2 (B) Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> spp. observado por microscópio óptico.....	177
Figura 3 Ceratite amebiana em adulto	200
Figura 4. Fatores de risco que contribuem para ceratite por <i>Acanthamoeba</i> spp. .	211

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
3 OBJETIVOS	9
4 REFERENCIAL TEÓRICO	10
4.1 Amebas de Vida Livre	10
4.2 Gênero <i>Acanthamoeba</i> spp.....	13
4.3 Morfologia.....	16
4.4 Identificação e Classificação	18
4.5 Doenças causadas por Amebas de Vida Livre.....	19
4.5.1 Ceratite Amebiana.....	19
4.5.2 Meningoencefalite amebiana primária.....	24
5 ARTIGO.....	28
6 CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS.....	32
ANEXOS	37

1 INTRODUÇÃO

Amebas de vida livre são protozoários distribuídos nos mais variados habitats, como água, solo, poeira, alimentos e ar atmosférico. São resistentes as mais variadas temperaturas e pH, podendo estar presente no solo por muitos anos. Em seu interior, bactérias, vírus ou outros protozoários podem ser usados como alimento (COULON et al., 2010).

Protozoários do gênero *Acanthamoeba* spp. constituem um grupo de amebas com elevado potencial patogênico, sendo ou não oportunistas para infecção, mas são capazes de provocar infecções graves e fatais. São responsáveis pela Ceratite Amebiana, uma grave infecção ocular que pode levar à cegueira e a Meningoencefalite Amebiana, doença grave com evolução rápida e fatal (QVARNSTROM et al., 2006).

Baseando-se no fato de que amebas de vida livre podem estar presentes em praticamente todos os locais, com possibilidade de ficarem inativas por vários anos à espera de um hospedeiro para causar infecções, e também da possibilidade de estarem presentes em ambientes hospitalares, onde existem grande quantidades de pacientes imunocomprometidos, este tipo de estudo é fundamental para que divulgue a necessidade de um maior aprofundamento sobre conhecimentos relativos às amebas, seus habitats e técnicas de identificação. Não menos importante, é necessário também um aprofundamento nas gravíssimas doenças que elas provocam e também na possibilidade de abrigarem bactérias altamente patogênicas (SCHUSTER,; VISVESVARA, 2004).

Algumas espécies de micobactérias conseguem se tornar resistentes à fagocitose da *Acanthamoeba* spp., e isso faz com que se desenvolvam em seu interior, tornando-as altamente patogênicas para doenças e infecções. Essas micobactérias estão muito presentes em ambientes hospitalares e são responsáveis por infecções em seres humanos (KOH et al., 2011).

Endossimbiontes de *Acanthamoeba* spp representam um grande risco para a saúde humana, pois usam o DNA das amebas para se tornarem resistentes e se reproduzirem sem lhes causar nenhum dano, fazendo com que elas se tornem vetores de doenças. Um cuidado especial quanto essas micobactérias que podem se desenvolver dessa maneira deve ser dado no âmbito do ambiente hospitalar, onde podem se propagar e contaminar instrumentos cirúrgicos que não podem ser

autoclavados, podendo assim abrigar amebas que estão somente aguardando um momento próprio para efetuar lise e proliferar a infecção (ESSER et al., 2008).

Nesse sentido, o estudo dos endossimbiontes de *Acanthamoeba* spp. tem se mostrado também de grande importância, pois através dessa identificação consegue-se o diagnóstico prematuro da infecção e um maior sucesso no seu tratamento, pois a exposição à esses agentes causadores de doenças é acentuada, devido sua grande distribuição e presença nos mais variados ambientes, inclusive hospitalares (CABRAL, PUFFENBARGER, CABRAL, 2000).

O presente estudo tem a finalidade de identificar sugestivamente amebas de vida livre em amostras de poeira da unidade de Terapia Intensiva Pediátrica do Hospital Santa Cruz, e através de teste de tolerância identificar seu potencial patogênico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar a presença de amebas de vida livre em amostras de poeira de ar condicionado da Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica do Hospital Santa Cruz e classificar sugestivamente essas amostras quanto ao seu gênero e seu potencial patogênico.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar a presença de *Acanthamoeba* spp;
- ✓ Realizar testes de tolerância para verificar o potencial patogênico;
- ✓ Classificar as amostras segundo os critérios morfológicos de PAGE 1988.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Amebas de Vida Livre

As amebas de vida livre são protozoários unicelulares distribuídos amplamente em ambientes tanto naturais como artificiais. Podem ser encontradas abundantemente em variados habitats, como água doce, água salgada, água mineral engarrafada, ar atmosférico, soluções para lentes de contato e de lavagem de olhos, esgoto, solo, poeira, alimentos, umidificadores, unidades de diálise e até mesmo em indivíduos saudáveis (CABRAL, PUFFENBARGER, CABRAL, 2000; MORALES et al., 2005).

Resistem à variações extremas de temperatura e outras condições adversas, podendo sobreviver a todas as fases do processamento de saneamento de água. São fagócitos onipresentes e tem a capacidade de alternarem de trofozoítos. Nessa fase, sua alimentação é baseada em bactérias, fungos ou algas. A alimentação de bactérias ocorre por fagocitose, entretanto algumas bactérias podem resistir a essa fagocitose multiplicando-se no interior das amebas de vida livre, representando um grande risco de saúde pública. São patógenos oportunistas ou parasitas facultativos, não necessitando de um hospedeiro para auxiliar na transmissão da doença e não ocorre transmissão de hospedeiro para hospedeiro (OVRUTSKY et al., 2013; FOUQUE et al., 2012).

Mesmo com frequente exposição da população às amebas de vida livre, não são relatados maiores danos à saúde, mas elas podem causar ceratite, uma infecção oportunista do sistema nervoso central. Isso faz com que seu estudo seja de grande interesse por serem ainda reservatórios para inúmeras bactérias patogênicas (REVIÉRE et al., 2006; MAGSHOOD et al., 2005).

Amebas de vida livre são importantes predadores de organismos procariotas, microrganismos eucarióticos, bactérias e fungos, exercendo uma grande influência sobre a comunidade microbiana. Alimentam-se ainda de micróbios, e isso faz com que contribuam para o crescimento de plantas, mineralização do solo e ciclos de nutrientes (ESSER et al., 2008; GREUB, RAOULT 2004).

Atualmente sabe-se que amebas de vida livre podem causar meningoencefalite, encefalite granulomatosa, ceratite (úlceras da córnea) e infecções nasofaríngeas e cutâneas, o que faz com que sejam necessárias pesquisas para

melhor compreensão desses parasitas, bem como sua patogenia e epidemiologia. Existem várias espécies dispersas na natureza, mas apenas algumas podem atingir seres humanos. Dentre elas, podemos citar a Família Schizopyrenidae, constituída por 14 gêneros, com apenas uma espécie, *Naegleria fowleri*, considerada patogênica; Família Hartmanellidae, constituída por 23 gêneros, entre eles o gênero *Acanthamoeba* que apresenta 8 espécies de interesse: *A. cullbertsoni*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. royreba*, *A. astronyxis*, *A. hatchetti*, *A. rhyodes* e *A. palestinesnis*. Para diagnóstico em patologias humanas, é adotado como *Acanthamoeba sp.* não designando a espécie; Família Leptomyxidae (da ordem Leptomyxida) onde estão as espécies *Leptomyxida* e *Balamuthia mandrilaris* (NEVES et al., 2005).

Em um estudo sobre a biodiversidade de amebas e amebas resistentes à bactérias em uma rede de água hospitalar, THOMAS et. al., (2006) coletou 200 amostras, desde amostras de água, esfregaços de torneiras e de chuveiros. As amostras foram coletadas da unidade de terapia intensiva, unidade cirúrgica e enfermaria de clínica médica e foi utilizado o método de PCR com sequenciamento do gene 18S rRNA. Uma estirpe de *Acanthamoeba polyphaga* foi isolada a partir de um swab de água da torneira e sobreviveu às temperaturas de 44 e 47° C, porém não apresentou crescimento nessa faixa de temperatura. Micobactérias foram isoladas em maiores quantidades e também através de sequenciamento do gene 16S rRNA por PCR. Comprovando que micobactérias estão diretamente associadas com amebas de vida livre nas redes de água. Neste estudo foi demonstrado que micobactérias podem crescer em co-culturas de amebas *in vitro*, e isso permitiu que uma nova espécie pudesse ser isolada, *Mycobacterium massiliense*, a partir de um escarro de um paciente.

FUKUMOTO et al., (2010) coletaram 90 amostras, de modo aleatório, do piso, pias e saídas do coletor de ar condicionado de um hospital na Universidade de Hokkaido, no Japão. Para a identificação das espécies os autores também utilizaram a técnica de PCR. Com essas amostras, foi possível realizar o isolamento de *Paraclamydia acanthamoebae*, uma bactéria intracelular que infecta amebas de vida livre. É considerada altamente patogênica em humanos para pneumonia hospitalar, e tem grandes implicações para a prevenção e controle de infecções hospitalares. Este estudo indica uma correlação significativa entre a prevalência de *Paraclamydia acanthamoebae* e *Acanthamoeba spp.* e essa associação tem efeito significativo no que diz respeito à sobrevivência a longo prazo e a possibilidade de poder se

espalhar através de um ambiente hospitalar através de *Acanthamoeba* spp. Experimentos *in vitro* comprovam que sem a presença de *Acanthamoeba* spp. a sobrevivência de *Paraclamydia acanthamoebae* não ultrapassa o período de 3 dias com temperatura de 30° C ou 15 dias a 15° C.

MUCHESA,; BARNARD.; BARTIE (2014) em estudo sobre ocorrência de amebas de vida livre em um hospital de ensino de Joanesburgo, na África do Sul, coletaram amostras de água e biofilmes. Foram coletadas 71 amostras, das quais 35 amostras de água de torneira, 30 de swab seco e 6 amostras de água de chuveiro. A temperatura da água variou entre 19° C e 27° C. Amebas foram observadas em 63 amostras, com identificação positiva do gênero *Acanthamoeba* spp. (sete espécies) baseado na morfologia. Este estudo comprova o risco pelo qual estão submetidos pacientes imunocomprometidos, pois ficam expostos ao potencial patogênico do gênero *Acanthamoeba* spp.

Analisando amostras coletadas em um centro médico dos Estados Unidos, OVRUTSKY et al., (2013) isolaram amebas de vida livre e micobactérias patogênicas. As amostras foram coletadas de áreas clinicamente relevantes. De um total de 88 amostras, 23 foram de água e 65 de biofilmes. Amebas de vida foram recuperadas na maioria das amostras de biofilmes e pertenciam ao gênero *Acanthamoeba* spp. Estes resultados foram comprovados pelo uso da técnica de PCR. As micobactérias foram isoladas em 26 das 88 amostras coletadas, confirmando também superioridade em amostras de biofilmes, prevalecendo isolados da espécie *M. gordonae*. O resultados indicam um aumento significativo com relação a presença de micobactérias quando existe a presença de amebas de vida livre, esse fato comprova um importante papel das amebas nas doenças pulmonar causadas por micobactérias.

MAHMOUDI et al., (2015) em estudo para identificação de amebas de vida livre em amostras de água, coletaram 34 amostras da Província de Guilan, no Irã. As amostras foram filtradas com filtros de membrana e a seguir foi realizada a extração do DNA para serem submetidas à técnica de PCR. Em 30 amostras obtiveram resultados positivos para amebas de vida livre, pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* spp. Esta alta prevalência ressalta que amebas de vida livre podem desempenhar um papel decisivo na transmissão também de oocistos de toxoplasma na área de abrangência do estudo.

4.2 Gênero *Acanthamoeba* spp.

Acanthamoeba são protozoários de vida livre que apresentam como característica seu elevado potencial patogênico. Pode ser isolado de diversos locais, como sistemas de água, torres de refrigeração, piscinas e redes de água de hospitais e aparelhos de ar condicionado. Como pode ser facilmente isolada, esse gênero está recebendo uma atenção especial nas últimas décadas, devido à possibilidade de produzir infecções graves e até mesmo fatais, tanto em seres humanos como em animais, e também pela sua presença nos mais variados sistemas de água, inclusive domésticos (ESSER et al., 2008; CHAN et al., 2011; HSUEH.; GIBSON, 2015).

Espécies de *Acanthamoeba* spp. infectam de forma mais acentuada indivíduos que tem o sistema imune comprometido. Essa infecção pode ocorrer por inalação ou por feridas presentes na pele, fazendo com que a partir desse ponto de entrada atinja o sistema nervoso central provocando a meningoencefalite amebiana, uma infecção rápida e fatal na maioria dos casos. *Acanthamoeba* é associada também a ceratite em indivíduos saudáveis que fazem uso de lentes de contato ou que possam ter sofrido trauma no olho. Relato de casos diagnosticados tem sido elevados nos últimos anos (QVARNSTROM et al., 2006).

Acanthamoeba spp., mesmo que sob condições adversas acentuadas podem permanecer viáveis por vários anos no meio ambiente e serem oportunistas ou não para infecções. Essas espécies são de extremo risco para a saúde pública, tendo em vista que podem ser reservatórios e veículos de propagação de bactérias (SCHUSTER.; VISVESVARA, 2004).

Atuam como hospedeiros para várias bactérias, além de ter a capacidade de acolher agentes patogênicos bacterianos, com especial atenção para espécies do gênero *Micobacterium*, sob duras condições ambientais. Isso contribui para a transmissão de agentes bacterianos suscetíveis e tem como consequência oferecer uma potencial via de entrada para o corpo humano (EDDYANI et al., 2008).

Atribuir um papel específico da *Acanthamoeba* spp. atribuído a uma infecção é muito difícil, pois são consideradas heterogêneas e dos grupos em que são classificadas, apenas certos subgrupos podem ser considerados patogênicos, atingindo essa classificação graças aos recentes avanços à sua taxonomia. (MAGSHOOD et al., 2005).

A patogênese da *Acanthamoeba* spp. está diretamente relacionada a variados fatores tanto diretos como indiretos. Atualmente estudos realizados confirmam que a ligação de *Acanthamoeba* spp. para a célula hospedeira é mediada por proteínas de ligação e manose, o que levam a eventos secundários, como fagocitose, apoptose e a secreção de proteínas extracelulares, que provocam dano celular e tecidual no hospedeiro. Serina e cisteína são os principais determinantes na patogênese de infecções, tendo como principal função a degradação dos tecidos do hospedeiro (MORALES et al., 2005).

Estudos em estações de tratamento de água comprovam a sobrevivência de amebas de vida livre ao tratamento de água durante todos os seus processos, inclusive a ozonização e cloração, aumentando assim a possibilidade de se encontrar esse gênero nos domicílios. Devido a isso, podem agir como reservatórios para bactérias. O controle de contaminação requer uma manutenção constante de todo o sistema de água (OVRUTSKY et al., 2013; THOMAS et al., 2004).

Em um estudo de caracterização de *Acanthamoeba* spp. COSTA et al., (2010), isolaram dois grupos diferentes em amostras de poeira de um hospital público na cidade de Curitiba, estado do Paraná, Brasil. As amostras foram coletadas de cinco diferentes áreas do hospital, e 2 a 5 dias após a coleta ficou evidente a presença de amebas de vida livre nas amostras após inoculação em ágar soja. Análises morfológicas de cistos e trofozoítos confirmaram como serem pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* spp. do grupo I e do grupo II. As características assemelham-se a *A. astronyxis* e *A. triangularis*, porém essa identificação por critérios morfológicos não foi confiável, pois a morfologia pode variar devido a fatores como cultivo e condição das amostras. Todos os isolados e clones foram confirmados pela técnica de PCR, analisando a variação da sequência do gene 18S rDNA, com 1100 pb de produto correspondendo como pertencente aos grupo I e 930 pb como do grupo II, que são mais patogênicas do que do grupo I e incluem várias espécies usualmente associadas em condições clínicas.

CARLESSO et al., (2007) no estudo realizado em um hospital público na cidade de Porto Alegre, estado do Rio Grande do Sul, identificaram a presença de amebas de vida livre em 47 das 135 amostras coletadas de poeira e de biofilmes em 15 ambientes hospitalares diferentes. Todos os ambientes analisados apontaram a presença de amebas de vida livre, exceto o centro de tratamento intensivo. Das 47 amostras positivas para amebas de vida livre, 16 são pertencentes ao gênero

Acanthamoeba spp. Os ambientes com maiores que proporcionaram maiores isolamentos foram bebedouros e a cozinha. A ocorrência dessas amebas representa uma grande preocupação, pois pode fazer com que pacientes imunodeficientes possam ser alvos fáceis da proliferação de germes oportunistas, especialmente da espécie *Acanthamoeba* spp.

BRADBURY, FRENCH, BLIZZARD (2014) realizaram um estudo para avaliar a possibilidade de colonização das vias respiratórias e urinárias de pacientes de terapia intensiva com amebas de vida livre. Este estudo foi realizado no Royal Hobart Hospital, na Tasmânia. Foram coletadas 99 amostras de pacientes e nove amostras de água da Unidade de Terapia Intensiva, com todas elas sendo cultivadas e testadas pelo método de PCR. *Acanthamoeba* spp. foi isolada de três amostras, duas de dois pacientes coletadas com uma semana de intervalo e uma de um lavatório de um paciente da UTI. A primeira amostra coletada de paciente obteve um grande crescimento de espécies de *Acanthamoeba* spp. colhida enquanto o paciente era entubado. A segunda amostra teve um crescimento moderado e foi coletada após extubação do paciente e transferência para enfermaria geral. Embora a colonização do trato respiratório de pacientes internados em UTI com *Acanthamoeba* spp. possa parecer um evento raro, este estudo comprova que pode ocorrer, não sendo comumente detectado devido aos métodos muito específicos que são necessários para o diagnóstico clínico. Isso reforça ainda mais o significado do papel de *Acanthamoeba* spp. também como transportador de patógenos bacterianos em vias respiratórias de pacientes de terapia intensiva.

BAGHERI et al., (2010) realizaram um estudo em hospitais de 13 cidades do Irã, nos anos de 2007 e 2008. As 94 amostras foram coletadas de torneiras de água quente e água fria, de diferentes alas dos hospitais. A confirmação da existência de *Acanthamoeba* spp. foi realizada através de técnica de microscopia de fase reversa. Baseado nas características morfológicas, a presença de *Acanthamoeba* spp. foi confirmada em 45 amostras, coletadas em temperaturas entre 21° C e 48° C, comprovando uma significativa presença desses microorganismos em redes hospitalares de água que recebem tratamento.

AL-HERRAWY et al., (2014) identificaram espécies de *Acanthamoeba* spp. em piscinas na cidade do Cairo, Egito. Amostras de água foram coletadas a partir de 10 piscinas diferentes e cultivadas em ágar não nutriente para a detecção de *Acanthamoeba* spp. Os isolados foram confirmados por amplificação de PCR com

uso de iniciador específico. Das amostras coletadas, 49,2% foram confirmadas com membros pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* spp., sendo que seis espécies puderam ser confirmadas pelo método molecular. Esses resultados divulgam a possibilidade de como os seres humanos podem estar expostos a esses micro-organismos altamente patogênicos nos mais variados habitats que frequentam.

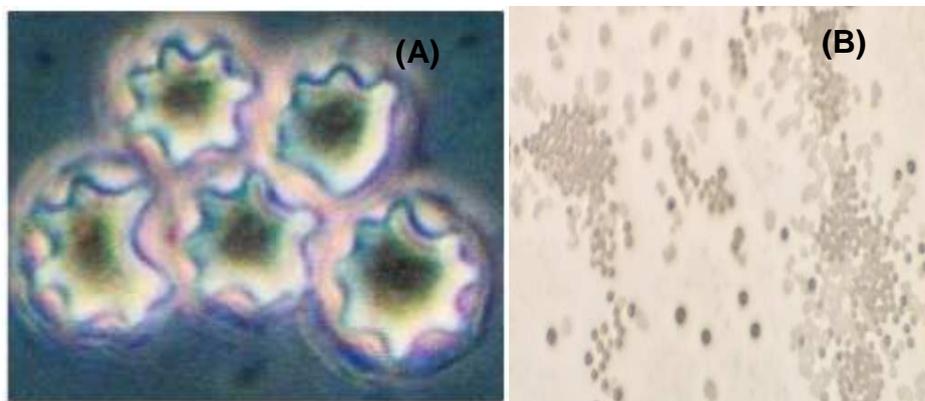
4.3 Morfologia

O ciclo de vida da *Acanthamoeba* spp. é composto por duas fases: trofozoíto e cisto. O cisto merece destaque por ser resistente à extremas condições, tanto físicas quanto químicas. O tamanho do cisto pode ser variado, ficando em torno de 13 µm a 20 µm variando de uma espécie para outra. Quando maduro, o cisto apresenta uma parede, tendo na sua camada exterior o ectocisto, composto de uma combinação de proteínas e polissacarídeos (MOON et al., 2014).

A Figura 1 (A) ilustra a morfologia do cisto de *Acanthamoeba* spp. denominado como do grupo I, apresentando cisto estrelado, em observações realizadas com microscopia eletrônica. A figura (B) ilustra cistos de *Acanthamoeba* spp. observados em microscópio óptico, com aumento de 40x.

A morfologia dos cistos sofre influência direta pelas condições de cultivo, fazendo com que culturas de amebas que foram clonadas possam apresentar cistos com aspectos morfológicos diferentes (CHAN et al., 2011).

Figura 1 (A) Cisto de *Acanthamoeba* spp. observado com microscopia eletrônica. **Figura 1 (B)** cisto de *Acanthamoeba* spp. observado com microscópio óptico.

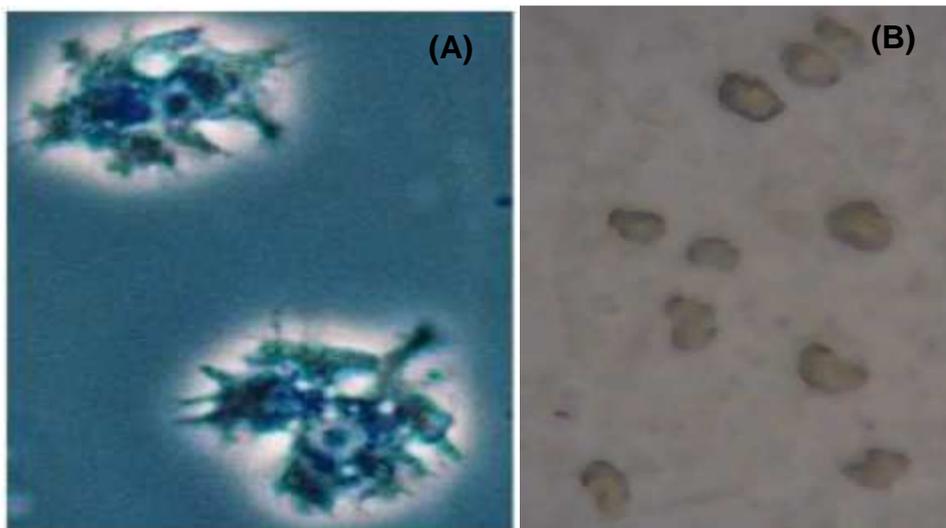


Fonte: Laboratório de Parasitologia UFRGS – Grupo de Pesquisa Amebas de Vida Livre

Separados por um espaço, na camada interna da parede do cisto encontramos o endocisto que é composto principalmente de celulose. As condições ambientais adversas, como alterações de temperatura, privação de alimento e dessecação não impedem a formação de cistos, e eles são ainda resistentes a antimicrobianos, biocidas e à cloração, sobrevivendo em temperaturas extremamente baixas. Todos esses fatores fazem com que fiquem viáveis por longos anos no ambiente (BEATTIE et al., 2003).

No estágio de trofozoíto, *Acanthamoeba* spp. encontra-se metabolicamente ativa, podendo se mover, com capacidade de multiplicação e sensível a estímulos nocivos, alimentando-se geralmente de bactérias e leveduras, algas e pequenas partículas orgânicas. A Figura 2 (A) ilustra a morfologia de trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. observada por microscopia eletrônica e a Figura 2 (B) trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. observados por microscopia óptica. Quando o ambiente em que vivem torna-se desfavorável ou negativo para que possa sobreviver, como exemplo dessecação, privação de nutrientes ou mudança significativa de temperatura, ocorre a transformação para cisto. Como características os trofozoítos apresentam uma espinha como pseudopodia e um nucléolo central localizado dentro do núcleo (CLARKE.;NIEDERKKORN, 2006; HSUEH.; GIBSON, 2015).

Figura 2 (A) Trofozoíto de *Acanthamoeba* spp. observado por microscopia eletrônica. **Figura 2 (B)** Trofozoíto de *Acanthamoeba* spp. observado por microscópio óptico.



Fonte: Laboratório de Parasitologia UFRGS – Grupo de Pesquisa Amebas de Vida

4.4 Identificação e Classificação

A identificação de *Acanthamoeba* spp. quanto ao nível de gênero pode ser realizada sem maiores dificuldades, pois em sua superfície encontramos projeções espinhosas, sobre trofozoítos, que se denominam acanthopodia. Quando a classificação passa a ser realizada por critérios morfológicos para a determinação da espécie, a identificação passa a apresentar maiores dificuldades. Devido a isso, o gênero *Acanthamoeba* spp. foi dividido em três grupos morfológicos que foram criados com base na forma e no tamanho do cisto, segundo (KHAN, 2006).

GRUPO I – neste grupo estão inclusas as espécies que apresentam como característica cistos grandes, de tamanho bem maior se comparado com as espécies dos grupos II e III. Seu diâmetro médio fica em torno de 20µm e tem como característica um endocisto com parede de forma estrelada e ectocisto com formato esférico. Fazem parte desse grupo as espécies *A. astronyxis*, *A. commandoni*, *A. echinulata*, *A. pearcei* e *A. tubiashi*. Embora essas espécies não são consideradas patogênicas, existe relato de infecção granulomatosa cerebral pela espécie *Acanthamoeba astronyxis* (CABRAL.; CABRAL, 2003; QVARNSTROM,.; NERAD.; VISVESVARA, 2013).

GRUPO II – enquadram-se nesse grupo espécies cujos cistos apresentam diâmetro inferior a 18µm. O endocisto possui forma estrelada, oval, triangular ou quadrangular com o ectocisto seguindo praticamente esses contornos. Nesse grupo incluem-se as espécies *A. castellanii*, *A. divionensis*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. lugdunensis*, *A. mauritaniensis*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhyodes*, *A. stevensoni* e *A. triangularis*. Nesse grupo estão as espécies que são isoladas com maior frequência em casos de meningoencefalites e ceratites (WALOCHNIK, 2000; CABRAL.; CABRAL, 2003; FUERST, 2014).

GRUPO III – nesse grupo, o endocisto apresenta forma globulosa ou oval, e jamais apresenta a forma estrelada. O diâmetro médio dos cistos são também de 18µm e a observação do ectocisto é muito difícil por ser delgado e liso, justaposto ao ectocisto. Pertencem a este grupo as espécies *A. culbertsoni*, *A. healyi*, *A. jacobsi*, *A. lenticulata*, *A. lenticulata*, *A. palestinensis*, *A. postulosa* e *A. royreba* (WALOCHNIK, 2000; CABRAL.; CABRAL, 2003; FUERST, 2014).

Atualmente, a identificação de cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. é realizada pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real,

com sonda específica e ainda possibilidade de se realizar a discriminação de gênero. Esta técnica é altamente sensível e muito mais rápida, o que é fator determinante na detecção, principalmente se relacionada às Amebas Resistentes à Bactérias. Essas bactérias, na sua maioria patogênicas, ou altamente patogênicas, tratam-se de trofozoítos que se tornaram resistentes a fagocitose e conseguiram assim se multiplicar no interior das células das amebas (REVIERE, 2006).

Ensaio convencionais exigem uma série de diluições de amostras, culturas de amebas com bactérias inoculadas e realização do cálculo de número mais provável, o que faz com que dados e informações sobre *Acanthamoeba* spp. de meio ambiente sejam muito restritos. Essas limitações fazem com que o pouco conhecimento sobre elas limitem o risco que as mesmas representam para a saúde humana bem como o desconhecimento da ocorrência, replicação e persistência dos seus parasitas bacterianos (CHANG, 2010).

A técnica de PCR para a identificação de gêneros de *Acanthamoeba* spp. tem como base a amplificação da sequência da subunidade menor de gene de rRNA, especificamente o gene 18S rDNA, que classifica isolados de *Acanthamoeba* em 18 genótipos diferentes (nomeados como T1, T2a, T2b até T17). O genótipo T4 predomina em espécies clínicas e fontes ambientais. Os genótipos T2a, T3, T4, T6 e T11 são os que causam a ceratite. Espécies causadoras da encefalite amebiana granulomatosa estão nos genótipos T1, T4, T10 e T12 (NUPRASERT et al., 2010; KHAN, 2006)

Atualmente existem técnicas de PCR capazes de realizar a quantificação simultânea dos principais gêneros *Acanthamoeba* spp. em uma mesma reação, com alta especificidade e sensibilidade, apresentando resultados precisos e confiáveis. Isso faz desse método molecular uma alternativa mais rápida em relação aos demais métodos convencionais (CALVEZ et al., 2012).

4.5 Doenças causadas por Amebas de Vida Livre

4.5.1 Ceratite Amebiana

Ceratite amebiana é uma infecção ocular que pode levar à cegueira, causada por amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* spp. podendo ser encontrada nos mais variados ambientes em todo o mundo. Os casos ocorrem praticamente na

sua totalidade em usuários de lentes de contato imunodeficientes e que não conseguem realizar a descontaminação das lentes de forma eficaz. Pode ainda ocorrer em indivíduos que sofreram trauma na córnea e naqueles que fazem a desinfecção das lentes usando água da torneira ou outras preparações caseiras. Outro fator de risco que pode ser citado é a prática de nadar ou tomar banho enquanto estiver fazendo uso de lentes de contato (BOGGILD et al., 2009).

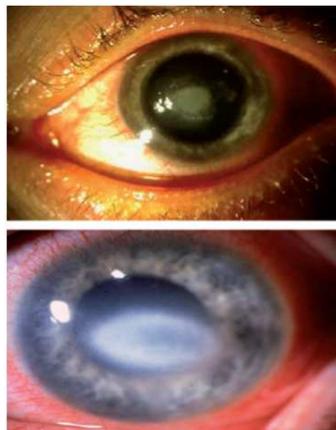
A figura 3 representa *Acanthamoeba* spp. infectando olho humano e exibindo a gravidade da doença. Merece destaque o epitélio e estroma ulcerada na infiltração, exibindo uma córnea com ceratite por *Acanthamoeba* (KHAN, 2006).

A maioria dos isolados de *Acanthamoeba* spp. responsáveis pela ceratite amebiana abrigam um ou mais endossimbiontes bacterianos. A presença desses endossimbiontes aumenta a patogenicidade da córnea e podem afetar o tempo de detecção e as características clínicas da ceratite amebiana (IOVIENO et al., 2010).

Como sintomas característicos que se manifestam na fase inicial de infecção têm a ptose palpebral, hiperemia conjuntiva e úlceras epiteliais, muitas vezes seguidas por aparecimento de um infiltrado estromal em forma de anel em fases posteriores da doença. Caso não seja possível um diagnóstico breve, essas infecções descontroladas progridem e requerem a remoção do olho (CLARKE, NIEDERKORN, 2006).

Dentre as várias espécies causadoras da infecção córnea que origina a Ceratite, podemos citar como mais frequentemente isoladas as amebas de vida livre *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. rhyodes* e *A. griffinni*. Da mesma forma, as lesões são provenientes de microtraumatismo no olho ou partículas do ar ou solo que contenham cistos amebianos (SILVA, ROSA 2003).

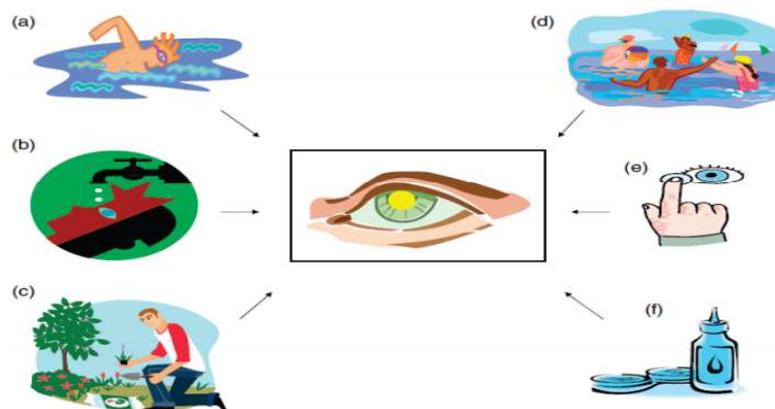
Figura 3 Ceratite amebiana em adulto



Fonte: KHAN, 2006

O genótipo T4 é o mais predominante para lesões oculares, que causam a ceratite, com muitos relatos descritos na literatura. Um dos fatores que justificam o grande envolvimento deste genótipo no diagnóstico dessa doença é o fato de que são mais abundantes no meio ambiente, o que possibilita que os hospedeiros sejam mais suscetíveis a manterem contato com essas espécies. Pode-se ainda dizer que esse genótipo possui uma maior patogenicidade e transmissibilidade, o que faz com que sejam amplamente distribuídos no habitat e aumenta a possibilidade de serem contraídos por seres humanos, e apresentam uma grande capacidade de se ligarem a lentes de contato e suscetibilidade diminuída a desinfetantes (MAGSHOOD et al., 2005). Vários fatores de risco contribuem para a ceratite amebiana, conforme figura 4.

Figura 4. Fatores de risco que contribuem para ceratite por *Acanthamoeba* spp.



Fonte: KHAN, 2006

Uma lente de contato pode ser considerada um vetor mecânico para o transporte de *Acanthamoeba* spp. se colocada sobre a córnea, ocorrendo a invasão de tecido corneal e levando à ceratite. Quando transferida para o olho através da lente de contato, é provável que atinja a cavidade nasal via drenagem lacrimal, o que não representa problema para indivíduos saudáveis, porém implica em graves problemas para indivíduos imunocomprometidos (BEATTIE et al., 2003).

Para um diagnóstico rápido, é utilizada a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), analisando o gene 18S rDNA, oferecendo uma enorme vantagem com relação aos métodos tradicionais com menor trabalho, tempo para diagnóstico mais rápido e maior sensibilidade o que proporciona um resultado clínico relevante (BOGGILD et al., 2009).

CHIN et al., (2014) em um estudo de 10 anos sobre a apresentação clínica, resultados de investigação e do tratamento de pacientes diagnosticados com ceratite por *Acanthamoeba*, relata que dos 15 olhos diagnosticados, 13 foram tratados por *Acanthamoeba keratitis*. Dos 13 pacientes diagnosticados no estudo, 12 eram usuários de lentes de contato, o que confirma que a grande maioria de pacientes diagnosticados faz isso de lentes, ficando assim mais exposto á incidência da doença. Como sinais oculares da doença, pode-se citar o aspecto de vidro despolido da córnea, inflamação da câmara anterior, infiltrado anel, defeito epitelial, infiltrados perineurais e lesões satélites. Quanto ao uso das lentes de contato, cinco pacientes tinham história de cuidados inadequados no uso, como lavagem das lentes com água da torneira, uso de lentes no chuveiro durante o banho, spa ou piscina, e desgaste por uso durante a noite. Em dois casos, porém, foi necessária a intervenção cirúrgica, devido à infecção da córnea ter se descontrolado e ocorrido o afinamento progressivo da córnea. Com este estudo, fica evidenciado que o uso de lentes de contato é um importante fator de risco para ceratite por *Acanthamoeba*

HONG (2014) relata o caso de uma paciente de 56 anos, da cidade de Shangai, China, usuária há mais de 5 anos de lentes de contato descartáveis gelatinosas, com suspeita de uma úlcera na córnea. Relata que a paciente eventualmente lavava suas lentes com água da torneira ao invés de utilizar solução salina estéril, que é o procedimento correto. A paciente não relata ter sofrido trauma ocular ou desgaste da lente. Com base na cultura microbiana, o diagnóstico inicial foi de ceratite amebiana. O primeiro tratamento com antibióticos não apresentou melhoras e a paciente foi então submetida a um exame por microscopia confocal *in vivo* onde foram encontrados os cistos de *Acanthamoeba* spp.. Após tratamento específico por 3 meses a presença de cistos não é mais confirmada e o tratamento se prolongou por um período de 12 meses, com gradual redução de dosagens. Esse relato de caso enfatiza a necessidade extrema de se suspeitar de uma infecção por *Acanthamoeba* spp. em pacientes usuários de lentes e que não apresentam melhoras à terapias antimicrobianas habituais, bem como em pacientes que ceratite ulcerativa com agravamento progressivo de úlceras de córnea.

Em um estudo realizado em um hospital particular na China, SONG et al., (2012) analisaram dados sobre ceratite microbiana pediátrica, entre Janeiro de 2000 até 31 de Dezembro de 2009. Foram analisados prontuários médicos submetidos a protocolos, de crianças com idades de 16 anos ou menos. 76 pacientes foram

incluídos no estudo, dos quais 69 viviam na zona rural e 47 casos o olho envolvido foi o olho direito. O principal fator predisponente para a ceratite foi o trauma (58,8% dos casos). Uma maior incidência da doença foi confirmada em pacientes com 16 anos, o que está diretamente relacionado ao fato de que 90% dos pacientes vivem na zona rural e na China crianças com essa idade exercem atividades agrícolas em épocas de colheita. Segundo os autores, técnicas avançadas e modernos equipamentos podem ser fatores determinantes para a diminuição das taxas cirúrgicas e possibilidade de diagnósticos mais precisos, diminuindo casos de graves lesões na córnea.

TANHEHCO, COLBY (2010) realizaram um estudo no Massachusetts Eye, hospital de olhos, com foco na análise de pacientes diagnosticados com ceratite amebiana com culturas de córneas positivas. Características clínicas foram analisadas entre os meses de Janeiro de 2000 e Dezembro de 2008. Como resultados, 4 casos foram identificados entre Janeiro de 2000 e Dezembro de 2003 e 26 casos entre Janeiro de 2004 e Dezembro de 2008, dos quais 15 com acompanhamento superior a 6 meses. Os fatores de risco identificados nesses 15 casos foram desgaste de lentes de contato, exposição à água doce ou água salgada, doenças crônicas da superfície ocular, trauma ocular e ceratite infecciosa concomitante. Com estes dados, os autores evidenciam a necessidade e prioridade da realização de campanhas de prevenção, principalmente no que diz respeito ao correto uso e manejo de soluções e limpeza de lentes de contato. A falta de higiene é um dos fatores impicantes para grande maioria dos casos de ceratite.

KU, CHAN, BECKINGSALE (2009) analisaram o aumento do número de pacientes diagnosticados com ceratite amebiana em um hospital na cidade de Brisbane, na Austrália, por período de 4 anos. Foram indentificados 13 casos de ceratite amebiana. Entre Janeiro de 2003 e Março de 2006 foram 4 casos e os outros nove entre Março de 2006 e Março de 2007. Apenas um paciente não fazia uso de lentes, os outros 12 usavam lentes de contato gelatinosas, com destaque para um deles que efetuava a higiene da lente com água direto da torneira. Com esses dados, comprova-se um aumento significativo nas infecções provocadas por *Acanthamoeba* spp. em ceratite amebiana. Um fator determinante é a solução usada para a limpeza das lentes, o momento de sua higienização. Uma correta campanha de uso dessa solução, bem como a conscientização dos usuários de lentes sobre

sua importância, podem fazer com que a identificação de casos da doença possam ser diminuídos.

4.5.2 Meningoencefalite amebiana primária

Trata-se de uma doença com evolução rápida e fatal, e seu agente etiológico é *Naegleria fowleri*. Sua abrangência inclui crianças e também jovens sem deficiência do sistema imune, considerados saudáveis, que praticam natação em piscinas aquecidas ou que tiveram contato com águas termais, além ainda de lagos e rios. Como porta de entrada, sugere-se que seja a cavidade nasal, através de aspiração de água ou inalação de poeira que contenham cistos amebianos (SILVA, ROSA, 2003).

Após uma eventual multiplicação no local, as amebas atravessam a mucosa nasal e a lâmina crivosa do osso etmoide e invadem o cérebro, onde causam a hemorragia, inflamação e extensa necrose. A morte ocorre de 10 a 14 dias após a exposição, com vários casos relatados em todo o mundo. *Naegleria fowleri* é altamente patogênica em seres humanos, cresce preferencialmente em água quente e já foi isolada de fontes, tanto naturais como artificiais (CABANES et al., 2001).

Como é isolada a partir de águas termais, é termotolerante, com crescimento preferencialmente em temperatura de 37°C, mas pode sobreviver à temperaturas mais altas, de até 45°C. *Naegleria fowleri* pode ser encontrada em forma de cisto, amebas ou flagelado. Os trofozoítos variam em tamanhos de 10 a 35 µm e são o estágio infeccioso primário, mas a forma de cisto, que pode ser transportada pelo vento, é a que está associada aos casos de Meningoencefalite Amebiana Primária. Como a doença não é diagnosticada a tempo, e na maioria das vezes de forma incorreta, a maioria dos casos são diagnosticados post-mortem. Quando o diagnóstico é confirmado, o tratamento é feito principalmente com o uso de anfotericina B, um antibiótico antifúngico, administrado de forma intravenosa ou intratecal, em associação com miconazole ou fluconazol e rifampicina (HERMAN et al., 2012).

Mesmo sendo a primeira opção de tratamento, a anfotericina B exige a administração de altas dosagens, e seu uso está associado com toxicidade renal que se manifesta com azotemia e hipocalcemia, além ainda de poder causar anemia

e muitos pacientes relatam ainda calafrios, febres, náuseas, vômitos e dor de cabeça. Recentemente, a FDA (Food and Drug Administration), órgão dos Estados Unidos responsável pelos testes com novos medicamentos, aprovou um novo medicamento, o Corifungin, como nova opção primária para o tratamento de meningoencefalite amebiana. Por ser mais solúvel em água, sua atividade é maior do que a anfotericina B, o que faz com que seja uma opção terapêutica promissora (DEBNATH et al., 2012).

O diagnóstico de *Naegleria fowleri* em seres humanos é muito difícil, pois os sintomas iniciais da doença podem ser confundidos com várias outras doenças. Em casos isolados, o diagnóstico mais rápido aumenta a possibilidade de sobrevivência do paciente diagnosticado. Como alternativa mais rápida do que métodos de cultura, temos a técnica de PCR em tempo real, altamente eficiente e específica para detecção precoce de *Naegleria fowleri*, de amostras tanto clínicas como ambientais (MADAROVÁ et al., 2009).

SHARIQ et al., (2014) relata o caso de um paciente do sexo masculino, com idade de 42 anos que exercia atividades na exploração avícola na cidade de Karachi, no Paquistão. O paciente ingressou no hospital local com febre alta, vômitos e perturbação de comportamento, sem nenhum registro de doença grave ou de processo cirúrgico ou contato com drogas. Como procedimento de rotina, costumava se refrescar com água da torneira durante o exercício de suas atividades, lavando o rosto e narinas. Dores de cabeça fraca foram relatadas pelo paciente, com gradual aumento da dor ao ponto de ter início às convulsões chegando a ser desorientadas e letárgicas. Quando atingiu essa situação, sua família o levou para o hospital, após primeiros exames não foi constatada nenhuma alteração. Após coleta do líquido cefalorraquiano para análise por PCR, iniciou-se o tratamento para uma suposta meningite e encefalite viral. A análise de uma amostra preparada para ser observada em microscópio, com aumento de 40x indicou a presença de trofozoítos de *Naegleria fowleri*. Após isso o diagnóstico de Meningoencefalite amebiana primária foi confirmado pelos médicos e o paciente foi imediatamente transferido para uma unidade de terapia intensiva e iniciou tratamento com anfotericina B. Mesmo com o início desse tratamento, a situação do paciente se agravou, com diminuição da saturação de oxigênio foi necessário o uso de ventilação mecânica e controle da pressão sanguínea. Três dias após ser admitido no hospital, exame de eletroencefalografia não revela nenhuma atividade cerebral no paciente e a pedido

da família a respiração artificial é retirada e o paciente vai a óbito. Esse relato de caso comprova que a Meningoencefalite amebiana primária é uma doença de extremo risco, com evolução fatal em praticamente a totalidade de casos diagnosticados. Como a ameba de vida livre *Naegleria fowleri* é facilmente encontrada na água, a possibilidade de infectar seres humanos é muito grande, não sendo necessário que se pratique natação ou outra atividade diretamente relacionada com a presença na água, pois um simples contato pode fazer com que a ameba ingresse no organismo pelo nariz e atinja o cérebro. Recentemente tem-se associado o aumento da temperatura global como um fator para o aumento de casos, pois a doença ocorre com maior frequência em áreas tropicais e nos meses de verão, e com o aumento de temperatura pode ocorrer em regiões onde ainda não existam casos relatados.

GOUDT et al., (2012) coletaram amostras de água doce de biofilmes para avaliação da dinâmica de crescimento e de densidade de *Naegleria fowleri*. Foram utilizadas duas temperaturas distintas, de 32° C e 42° C por um período de 45 dias, sendo que a temperatura e o nível de nutrientes afetam significativamente a densidade das amebas. Aos 32° C observa-se uma densidade muito baixa de amebas representando assim um estado de sobrevivência. Porém, quando empregada a temperatura de 42° C o que se observa é um estado de crescimento ativo, que depende do nível de nutrientes disponíveis, com necessidade de 104 bactérias para cada ameba poder efetuar crescimento. Com este estudo, foi possível concluir que a temperatura e a disponibilidade de bactérias tem como função promover não só o crescimento de *Naegleria fowleri*, mas também sua sobrevivência.

TUNG et al., (2013) realizaram um estudo em amostras de água coletadas de um resort com piscinas de água quente e de água fria, que foi visitado por paciente que foi comprovado como o primeiro caso de meningoencefalite amebiana primária de Taiwan. Os resultados obtidos indicaram que 32% das amostras coletadas (total de 25 amostras) apresentaram contaminação por *Naegleria fowleri*, tanto de águas termais como banheiras de água fria ou águas residuais. O início desse estudo se deu após uma campanha de desinfecção e as análises foram efetuadas por PCR, e é o primeiro em que *Naegleria fowleri* foi isolada tanto de amostras de água como de um paciente com diagnóstico confirmado. A fonte termal foi sugerida com principal fonte de contaminação, e como consequência do estudo, foi realizada uma

desinfecção e limpeza em todas as piscinas e banheiras do resort. Dessa forma, os autores puderam concluir que contaminação amebiana representa uma ameaça grave para pessoas que executam atividades de lazer em fontes termais.

Outro estudo com objetivo de detectar a presença de *Naegleria fowleri* foi realizado por VILLA, PEÑA (2010), na cidade de Sonora, México. Foram coletadas amostras mensalmente de águas naturais usadas para fins recreativos, e foi estabelecida uma correlação entre o aumento de temperatura da água com a presença da ameba. O estudo se estendeu durante os meses de Novembro de 2007 e Outubro de 2008. Ao longo desse tempo, as variações de temperatura da água ficaram entre 18° a 22° C durante a estação do inverno e 23 a 35° C na estação do verão. Uma maior detecção ocorreu nos meses em que a temperatura manteve-se acima dos 30° C, de Agosto a Novembro, estendendo-se até a diminuição da temperatura, nos meses de inverno. Pode-se concluir então que em meses com temperaturas elevadas são necessárias medidas para o controle do aparecimento de *Naegleria fowleri*.

ITHOI et al., (2011), na Malásia, detectaram a presença de *Naegleria fowleri* em amostras ambientais de água e de poeira. Um fator determinante para a realização desse estudo foi o fato de que os médicos dessa região não possuem elevado conhecimento com relação às infecções causadas por *Naegleria fowleri* e diagnósticos de meningoencefalite amebiana primária. Foram isoladas 41 amostras (33 de água e 8 de poeira), das quais todas foram submetidas a PCR com iniciadores específico e sequenciamento de DNA e testes de tolerância à temperatura. Embora nenhuma amostra revelou espécie patogênica para a região, este estudo enfatiza a necessidade de médicos e profissionais de saúde estarem preparados para futuros casos da doença, que é altamente fatal na maioria dos casos confirmados.

5 ARTIGO

Os materiais e métodos, resultados e discussão serão apresentados na forma de artigo científico.

O artigo será submetido à Revista de Saúde Pública.

Identificação de amebas de vida livre em poeira de ar condicionado de Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica de um hospital escola do interior do Rio Grande do Sul

Identification of free-living amoebae in air conditioning dust Pediatric Intensive Care Unit of a hospital school in the interior of Rio Grande do Sul.

Paulo Roberto Alves¹, Danielly Joani Bullé²

¹*Aluno do Curso de Farmácia de Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC)*

²*Profª Ms. Do Curso de Farmácia (UNISC)*

Santa Cruz do Sul – RS – Brasil

RESUMO

Objetivo

Identificar a presença de amebas de vida livre na poeira do ambiente hospitalar, da UTI Pediátrica de um hospital escola do interior do Rio Grande do Sul, e realizar um estudo para definir sugestivamente a quais gêneros pertencem verificando o seu potencial patogênico.

Métodos

Foram coletadas 74 amostras de poeira de ar condicionado do hospital escola, no município de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul. O local de coleta foi a Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica. As mostras foram semeadas em ágar não nutriente com *Escherichia coli* inativadas pelo calor. As amebas isoladas foram identificadas sugestivamente seguindo os critérios morfológicos, sugeridos por PAGE (1988)²², baseados no movimento, tamanho de cistos e trofozoítos, tempo de contração dos vacúolos contráteis, presença de acantopódios e aspectos morfológicos de trofozoítos e cistos. Testes de tolerância foram realizados para identificar o potencial patogênico das amebas de vida livre isoladas das amostras.

Resultados

A positividade para a presença de amebas de vida livre nas amostras coletadas foi de 67,56%, classificadas como potencialmente patogênicas. O gênero *Acanthamoeba* foi sugestivamente o predominante em todas as amostras, de acordo com observação morfológica baseada nos critérios de PAGE (1988)²². Nenhuma amostra apresentou características pertencentes ao gênero *Naegleria*.

Conclusões

Foi possível identificar sugestivamente o gênero das amebas da UTI Pediátrica, bem como classificá-las segundo seu potencial patogênico.

ABSTRACT

Objective

Identify the presence of free-living amoebae in the hospital, the pediatric ICU of a hospital school in the interior of Rio Grande do Sul, and conduct a study to define suggestively to which genera belong and which species, verifying their pathogenic potential.

METHODS

74 samples of dust with air conditioning were collected from the hospital school in the city of Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul. The collection site was the Pediatric Intensive Care Unit. Samples were plated on non-nutrient agar with *Escherichia coli* heat-inactivated. suggestively the amoebae were identified following morphological criteria suggested by PAGE (1988)²², motion-based, the size of the cyst and trophozoite, the contractile vacuole contraction time, morphology and the presence of acantopódios trophozoites and cysts. Tolerance test was performed to identify potential pathogenic amoebae free life of isolated samples.

RESULTS

The positive for the presence of free-living amoebae in the samples was 67.56%, classified as potentially pathogenic. The *Acanthamoeba* was suggestively predominant in all samples, according to morphological observation based on criteria PAGE (1988). No samples showed characteristics belonging to the genus *Naegleria*.

CONCLUSIONS

Could suggestively identify the gender of amoebae of the Pediatric ICU and classify them according to their pathogenic potential.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Este é o primeiro estudo de isolamento de amebas de vida livre realizado nesse hospital escola.
- ✓ 74 amostras foram coletadas; 50 positivas (67,57%) para amebas de vida livre e 24 (32,43%) negativas;
- ✓ O teste de termotolerância em temperatura de 37°C apresentou 30 amostras positivas (60%) e 20 negativas (40%) para crescimento amebiano.
- ✓ Na temperatura de 42°C foram identificadas 11 amostras positivas (22%) para crescimento amebiano e 39 negativas (78%);
- ✓ Dentre todas amostras positivas, 9 foram classificadas como de baixo potencial patogênico;
- ✓ O teste de osmotolerância a 0,5M de manitol indicou crescimento amebiano em 22 amostras (44%). As outras 28 amostras (56%) não apresentaram crescimento;
- ✓ Na concentração de 1M de manitol nenhuma amostra apresentou crescimento amebiano;
- ✓ O teste de exflagelação para identificação de *Naegleria* foi negativo em todas as amostras positivas analisadas;
- ✓ Medidas de desinfecção mais eficientes são necessárias para o controle da presença de amebas de vida livre no ambiente hospitalar estudado;

REFERÊNCIAS

- AL-HERRAWY, A. et al., *Acanthamoeba* species in Swimming Pools of Cairo, Egypt. *Iranian Journal of Parasitology*. v.9, n.2, p.194-201, 2014. Fator de Impacto: 0.857.
- BAGHERI, H. R. et al., Isolation of *Acanthamoeba* spp. from Drinking Waters in Several Hospitals of Iran. *Iranian Journal of Parasitol.* v.5, n.2, p.19-25, 2010. Fator de Impacto: 0.857.
- BEATTIE, T. K. et al., Enhanced Attachment of *Acanthamoeba* to Extended-wear Silicone Hydrogel Contact Lenses. *Ophthalmology*. v.10, n.4, 2003. Qualis A1.
- BOGGILD, A. K. et al., Laboratory Diagnosis of Amoebic Keratitis: Comparison of Four Diagnostic Methods for Different Types of Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. v.47, n. 5, p.1314-1318, 2009. Qualis A2.
- BRADBURY, R.S.; FRENCH, L.P.; BLIZZARD, L, Prevalence of *Acanthamoeba* spp. in Tasmanian intensive care clinical specimens. *Journal of Hospital Infection*. v.86, n.3, p.178-181, 2014. Qualis A2.
- CABANES, P. A. et al., Assessing the Risk of Primary Amoebic Meningoencephalitis from Swimming in the Presence of Environmental *Naegleria fowleri*. *Applied and Environmental Microbiology*. v.67, n.7, p.2927-2931, 2001. Qualis A1.
- CABRAL, F. M.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. *Clinical Microbiology Reviews*. v.16, n.2, p.273-307, 2003. Qualis A2.
- CABRAL, F. M.; PUFFENBARGER, R.; CABRAL, G. A. The Increasing Importance of *Acanthamoeba* Infections. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. v.47, n.1, p.29-36, 2000. Qualis B1.
- CALVEZ, T. L. et al., Detection of free-living amoebae by using the multiplex quantitative PCR. *Molecular and Cellular probes*. v.26, n.3, p.116-120, 2012. Fator de Impacto: 1.852.
- CARLESSO, A. M. et al., 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. Qualis B3.
- CHAN, L. L. et al., Isolation and characterization of *Acanthamoeba* spp. from air-conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. *Acta Tropica*. v.117, n.1, p.23-30, 2011. Qualis B1.
- CHANG, C. W.; WU, Y. C.; MING, K. W. Evaluation of real-time PCR methods for quantification of *Acanthamoeba* in antropogenic water and biofilms. *Journal of Applied Microbiology*. v.109, n.3, p.799-807, 2010. Qualis B1.
- CHIN, J. et al., *Acanthamoeba* keratitis: 10-Year study at a tertiary eye care center in Hong Kong. *Contact Lens and Anterior Eye*. v.38, n.2, p.99-103, 2014. Fator de impacto: 1.367.

- CLARKE, D. W.; NIEDERKORN, J. Y. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Trends in Parasitology*. v.22, n.4, p.175-180, 2006. Qualis A1.
- COSTA, A. O. et al., Characterization of *Acanthamoeba* Isolates from Dust of a Public Hospital in Curitiba, Paraná, Brazil. *Journal of Eucaryotic Microbiology*. v.57, n.1. p.70-75, 2010. Qualis B1.
- COULON, C. et al., Resistance of *Acanthamoeba* Cysts to Disinfection Treatments Used in Health Care Settings. *Journal of Clinical Microbiology*. v.48, n.8, p.2689-2697, 2010. Qualis A1.
- DEBNATH, A. et al., Corifungin, a New Drug Lead against *Naegleria*, Identified from a High-Throughput Screen. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.56, n.11, p.5450-5457, 2012. Qualis A1.
- EDDYANI, M. et al., Occurrence of Free-Living Amoebae in Communities of Low and High Endemicity for Buruli Ulcer in Southern Benin. *Applied and Environmental Microbiology*. v.74, n. 21, p.6547-6553, 2008. Qualis A1.
- ESSER, S. S. et al., Diversity of Bacterial Endosymbionts of Environmental *Acanthamoeba* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. v.74, n.18, p.5822-5831, 2008. Qualis A1.
- FOUQUE, E. et al., Cellular, Biochemical, and Molecular Changes during Encystment of Free-living Amoebae. *Eukaryotic Cell*. v.11, n.4, p.382-387, 2012. Qualis A2.
- FUERST, Paul. Insights from the DNA databases: Approaches to the phylogenetic structure of *Acanthamoeba*. *Experimental Parasitology*. v.145, n.1, p.S39-S45, 2014. Qualis B2.
- FUKUMOTO, T. et al., Impact of Free-Living Amoebae on Presence of *Parachlamydia acanthamoebae* in the Hospital Environment and Its Survival *In Vitro* without Requirement for Amoebae. *Journal of Clinical Microbiology*. v.48, n.9, p.3360-3365, 2010. Qualis A2.
- GOUDOT, S. et al., Growth dynamic of *Naegleria fowleri* in a microbial freshwater biofilm. *Water Research*. v.46. n.13, p.3958-3966, 2012. Qualis A1.
- GREUB, G.; RAOULT, D, Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. *Clinical Microbiology Reviews*. v.17, n.2, p.413-433, 2004. Qualis A1.
- HERMAN, E. K. et al., The Mitochondrial Genome and a 60-kb Nuclear DNA Segment from *Naegleria fowleri*, the Causative Agent of Primary Amoebic Meningoencephalitis. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. v.60, n.2, p.179-191, 2013. Qualis B1.
- HONG, J. et al., An unusual case of *Acanthamoeba Polyphaga* and *Pseudomonas Aeruginosa* keratitis. *Diagnostic Pathology*. v.9, n.1, p.105-107, 2014. Qualis B1.

HSUEH, T. Y.; GIBSON, K. E. Interactions between Human Norovirus Surrergates and *Acanthamoeba* spp. *Applied and Environmental Micribiology*. v.81, n.12, p.4005-4013, 2015. Qualis A1.

IOVIENO, A. et al., Detection of Bacterial Endosymbonts In Clinical *Acanthamoeba* Isolates. *Ophthalmology*. v.117, n.3, p.445-452, 2010. Qualis A1.

ITHOI, I. et al., Detection of *Nagleria* Species in Environment Samples from Peninsular Malaysia. *PLos One*, v.6, n.9, p.e.243247, 2011. Qualis A2.

KHAN, Naveed. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews*. v.30, n.4, p. 564-595, 2006. Qualis A2.

KOH et al., Clinical Significance of Differentiation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium abscessus*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. v.183, n.3, 2011. Qualis A1.

KU, J. Y.; CHAN, F. M.; BECKINGSALE, P, *Acanthamoeba* keratitis cluster: na increase in *Acanthamoeba* keratitis in Australia. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. v.37, n.2, p.181-190, 2009. Qualis B1.

MADAROVÁ, L. et al., A real-time diagnostic method for detection of *Naegleria fowleri*. *Experimental Parasitology*. v.126, n.1, p.37-41, 2010. Qualis B2.

MAGSHOOD, A. H. et al., *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran ando isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology*, v.54, n.8, p.755-759, 2005. Qualis B1.

MAHMOUDI, M. R. et al., Detection of *Acanthamoeba* and *Toxoplasma* in River Water Samples by Molecular Methods in Iran. *Iranian Journal of Parasitology*. v.10, n.2, p.250-257, 2015. Fator de Impacto: 0.857.

MOON, E. K. et al., Down-regulation of Cellulose Synthase Inhibits the Formation of Endocysts in *Acanthamoeba*. *Korean J Parasitol*. v.52, n.2, p.131-135, 2014. Qualis B1.

MORALES, J. L. et al., Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitology Research*. v.95, n.4, p.273-277, 2005. Qualis B1.

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, p.1-3, 2014. Fator de Impacto: 1.278.

NEVES, D. P. et al., *Parasitologia Humana*. 11^a edição, Editora Atheneu, p.139, 2005.

NUPRASERT, W. et al., Identification of a Novel T17 Genotype of *Acanthamoeba* from Environmental Isolates and T10 Genotype Causing Keratitis in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*. v.48, n.12, p.4636-4640, 2010. Qualis A2.

OVRUTSKY, A. R. et al., Cooccurrence of Free-Living Amoebae and nontuberculous Mycobacteria in Hospital Water Networks, and Preferential Growth of Mycobacterium avium in Acanthamoeba lenticulata. *Applied and Environmental Microbiology*. v.79, n.10, p.3185-3192, 2013. Qualis A1.

PAGE, F. C. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. (Culture Collection of Algae and Protozoa). Cumbria:England: *Freshwater Biological Association*, Ambleside, 1988.

QVARNSTROM, Y. et al., Multiplex Real-time PCR Assay for Simultaneous Detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *Journal of Clinical Microbiology*. v.44, n.10, p.3589-3595, 2006. Qualis A2.

QVARNSTROM, Y.; NERAD, T. A.; VISVESVARA, N. G, Characterization of a New Pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., Isolated from a Human with Fatal Amoebic Encephalitis. *Journal of Eucaryotic Microbiology*. v.60, n.6, p.626-633, 2013. Qualis B1.

REVIERE, D. et al., Development of a Real-time PCR assay for quantification of *Acanthamoeba* trophozoites and cysts. *Journal of Microbiological Methods*. v.64, n.1, p.78-83, 2006. Qualis B1.

SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal of Parasitology*. v.34, n.9, p.1001-1027, 2004. Qualis A2.

SHARIQ, A. et al., Fatal primary meningoencephalitis caused by *Naegleria Fowleri*. *Journal of the College of Physicians and Surgeons – Pakistan*. v.24, n.7, p.523-525, 2014. Fator de Impacto: 1.285

SILVA, M. A.; ROSA, J. A. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. *Revista de Saúde pública*. v.37, n.2, p.242-246, 2003. Qualis B2.

SONG, X. et al., Pediatric microbial keratitis: a tertiary hospital study. *European Journal of Ophthalmology*. v.22, n.2, p.136-141, 2012. Fator de Impacto 1.068.

TANHEHCO, T.; COLBY, K, The Clinical Experience of *Acanthamoeba* Keratitis at a Tertiary Care Eye Hospital. *Cornea*. v.29, n.9, p.1005-1010, 2010. Qualis B1.

THOMAS, V. et al., Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implications in *Legionella* persistence. *Journal of Applied Microbiology*. v.97, n.5, p.950-963, 2004. Qualis B1.

THOMAS, V. et al., Biodiversity of Amoebae and Amoebae-Resisting Bacteria in a Hospital Water Network. *Applied and Environmental Microbiology*. v.72, n.4, p.2428-2438, 2006. Qualis A1.

TUNG, M. C. et al., Identification and significance of *Negleria fowleri* isolated from the hot spring which related to the first primary amebic meningoencephalitis (PAM) patient in Taiwan. *International Journal of Parasitology*. v.43, n.9, p.691-696, 2013. Qualis A1.

VILLA, F. L.; PEÑA, C. H. Concentration of *Naegleria fowleri* in natural waters used for recreational purposes in Sonora, Mexico (November 2007-October 2008). *Experimental Parasitology*. v.126, n.1, p.33-36, 2010. Qualis B2.

WALOCHNIK, J.; OBWALLER, A.; ASPÖCK, H. Correlations between Morphological, Molecular Biological, and Physiological Characteristics in Clinical and Nonclinical Isolates of *Acanthamoeba* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. v.66, n.10, p.4408-4413, 2000. Qualis A1.

ANEXOS

ANEXO 1: Normas da Revista de Saúde Pública

A Revista de Saúde Pública tem por finalidade publicar contribuições científicas originais sobre temas relevantes para a saúde pública em geral. Está disponível na SciELO desde o seu primeiro número publicado em 1967, com texto completo. Os artigos publicados a partir de 2003, na versão em inglês, quando consultados no PubMed, poderão ser obtidos pelo link da SciELO. Possui Fator de Impacto JCR 2014 de 0,733 (Thomson Reuters) e Qualis A2 em Saúde Coletiva.

Os manuscritos submetidos à publicação na Revista de Saúde Pública devem ser apresentados de acordo com as Instruções aos Autores. São aceitos manuscritos nos idiomas: português, espanhol e inglês. O texto de manuscritos de pesquisa original deve seguir a estrutura conhecida como IMRD: Introdução, Métodos, Resultados e Discussão. Em cada uma das partes não se deve dividir o texto em subtítulos, exceto nos casos que requerem maior detalhe, sobretudo em Resultados e Discussão. Manuscritos baseados em pesquisa qualitativa podem ter outros formatos, admitindo-se Resultados e Discussão em uma mesma seção e Considerações Finais/Conclusões. Outras categorias de manuscrito (revisões, comentários, etc.) seguem os formatos de texto a elas apropriados. O texto submetido deve ter páginas e linhas numeradas para fins de revisão. O uso de siglas deve ser evitado.

ARTIGOS ORIGINAIS

Incluem estudos observacionais, estudos experimentais ou quase-experimentais, avaliação de programas, análises de custo-efetividade, análises de decisão e estudos sobre avaliação de desempenho de testes diagnósticos para triagem populacional. Cada artigo deve conter objetivos e hipóteses claras, desenho e métodos utilizados, resultados, discussão e conclusões. Incluem também ensaios teóricos (críticas e formulação de conhecimentos teóricos relevantes) e artigos dedicados à apresentação e discussão de aspectos metodológicos e técnicas utilizadas na pesquisa em saúde pública. Neste caso, o texto deve ser organizado em tópicos para guiar os leitores quanto aos elementos essenciais do argumento desenvolvido.

Instrumentos de aferição em pesquisas populacionais: Manuscritos abordando instrumentos de aferição podem incluir aspectos relativos ao desenvolvimento, à avaliação e à adaptação transcultural para uso em estudos populacionais, excluindo-se aqueles de aplicação clínica, que não se incluem no escopo da RSP.

Aos manuscritos novos de instrumentos de aferição, recomenda-se que seja apresentada uma apreciação detalhada do construto a ser avaliado, incluindo seu possível gradiente de intensidade e suas eventuais subdimensões. O desenvolvimento de novo instrumento deve estar amparado em revisão de literatura, que identifique explicitamente a insuficiência de propostas prévias e justifique a necessidade de novo instrumental.

Deve ser detalhada a proposição, a seleção e a confecção dos itens, bem como o emprego de estratégias para adequá-los às definições do construto, incluindo o uso de técnicas qualitativas de pesquisa (entrevistas em profundidade, grupos focais etc.), reuniões com painéis de especialistas, entre outras. O trajeto percorrido na definição da forma de mensuração dos itens e a realização de pré-testes com seus conjuntos preliminares necessitam ser descritos no texto.

A avaliação das validades de face, conteúdo, critério, construto e/ou dimensional deve ser apresentada em detalhe. Análises de confiabilidade do instrumento também devem ser apresentadas e discutidas, incluindo-se medidas de consistência interna, confiabilidade teste-reteste e/ou concordância inter-observador. Os autores devem expor o processo de seleção do instrumento final e situá-lo em perspectiva crítica e comparativa com outros instrumentos destinados a avaliar o mesmo construto ou construtos semelhantes.

Para os manuscritos sobre adaptação transcultural de instrumentos de aferição, além de atender, de forma geral, às recomendações supracitadas, faz-se necessário explicitar o modelo teórico norteador do processo. Os autores devem, igualmente, justificar a escolha de determinado instrumento para adaptação a um contexto sociocultural específico, com base em minuciosa revisão de literatura. Finalmente, devem indicar explicitamente quais e como foram seguidas as etapas do modelo teórico de adaptação no trabalho submetido para publicação.

Obs: O instrumento de aferição deve ser incluído como anexo dos artigos submetidos.

Informações complementares:

- Devem ter até 3.500 palavras, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas e figuras, limitadas a 5 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis, evitando-se tabelas muito longas. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas.
- As referências bibliográficas, limitadas a cerca de 25, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas. Caso não possam ser substituídas por outras, não farão parte da lista de referências bibliográficas, devendo ser indicadas nos rodapés das páginas onde estão citadas.

Os resumos devem ser apresentados no *formato estruturado*, com até 300 palavras, contendo os itens: Objetivo, Métodos, Resultados e Conclusões. Excetuam-se os ensaios teóricos e os artigos sobre metodologia e técnicas usadas em pesquisas, cujos resumos são no formato narrativo, que, neste caso, terão limite de 150 palavras.

A estrutura dos artigos originais de pesquisa é a convencional: Introdução, Métodos, Resultados e Discussão, embora outros formatos possam ser aceitos. A Introdução deve ser curta, definindo o problema estudado, sintetizando sua importância e destacando as lacunas do conhecimento que serão abordadas no artigo. As fontes de dados, a população estudada, amostragem, critérios de seleção, procedimentos analíticos, dentre outros, devem ser descritos de forma compreensiva e completa, mas sem prolixidade. A seção de Resultados deve se limitar a descrever os resultados encontrados sem incluir interpretações/comparações. O texto deve complementar e não repetir o que está descrito em tabelas e figuras. A Discussão deve incluir a apreciação dos autores sobre as limitações do estudo, a comparação dos achados com a literatura, a interpretação dos autores sobre os resultados obtidos e sobre suas principais implicações e a eventual indicação de caminhos para novas pesquisas. Trabalhos de pesquisa qualitativa podem juntar as partes Resultados e Discussão, ou mesmo ter diferenças na nomeação das partes, mas respeitando a lógica da estrutura de artigos científicos.

Comunicações Breves: São relatos curtos de achados que apresentam interesse para a saúde pública, mas que não comportam uma análise mais abrangente e uma discussão de maior fôlego.

Informações complementares:

- Devem ter até *1.500 palavras* (excluindo resumos, tabelas, figuras e referências) *uma tabela ou figura* e até 5 referências.
- Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais, exceto quanto ao resumo, que não deve ser estruturado e deve ter até *100 palavras*.

ARTIGOS DE REVISÃO

Revisão sistemática e meta-análise: Por meio da síntese de resultados de estudos originais, quantitativos ou qualitativos, objetiva responder à pergunta específica e de relevância para a saúde pública. Descreve com pormenores o processo de busca dos estudos originais, os critérios utilizados para seleção daqueles que foram incluídos na revisão e os procedimentos empregados na síntese dos resultados obtidos pelos estudos revisados (que poderão ou não ser procedimentos de meta-análise).

Revisão narrativa/crítica: A revisão narrativa ou revisão crítica apresenta caráter descritivo-discursivo, dedicando-se à apresentação compreensiva e à discussão de temas de interesse científico no campo da Saúde Pública. Deve apresentar formulação clara de um objeto científico de interesse, argumentação lógica, crítica teórico-metodológica dos trabalhos consultados e síntese conclusiva. Deve ser elaborada por pesquisadores com experiência no campo em questão ou por especialistas de reconhecido saber.

Informações complementares:

- Sua extensão é de até 4.000 palavras, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- O formato dos resumos, a critério dos autores, será narrativo, com até 150 palavras. Ou estruturado, com até 300 palavras.
- Não há limite de referências.

COMENTÁRIOS

Visam a estimular a discussão, introduzir o debate e "oxigenar" controvérsias sobre aspectos relevantes da saúde pública. O texto deve ser organizado em tópicos ou subitens destacando na Introdução o assunto e sua importância. As referências citadas devem dar sustentação aos principais aspectos abordados no artigo.

Informações complementares:

- Sua extensão é de até *2.000 palavras*, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências
- O formato do resumo é o narrativo, com até 150 palavras.
- As referências bibliográficas estão limitadas a cerca de 25

Publicam-se também Cartas Ao Editor com até 600 palavras e 5 referências.

AUTORIA

O conceito de autoria está baseado na contribuição substancial de cada uma das pessoas listadas como autores, no que se refere sobretudo à concepção do projeto de pesquisa, análise e interpretação dos dados, redação e revisão crítica. A contribuição de cada um dos autores deve ser explicitada em declaração para esta finalidade. Não se justifica a inclusão de nome de autores cuja contribuição não se enquadre nos critérios acima.

Dados de identificação do autor responsável (cadastro)

Nome e sobrenome: O autor deve seguir o formato pelo qual já é indexado nas bases de dados.

Correspondência: Deve constar o nome e endereço do autor responsável para troca de correspondência.

Instituição: Podem ser incluídas até três hierarquias institucionais de afiliação (por exemplo: departamento, faculdade, universidade).

IDENTIFICAÇÃO DO MANUSCRITO

Título no idioma original do manuscrito e em inglês: O título deve ser conciso e completo, contendo informações relevantes que possibilitem recuperação do artigo nas bases de dados. O limite é de 90 caracteres, incluindo espaços. Se o manuscrito for submetido em inglês, fornecer um título em português.

Título resumido: Deve conter até 45 caracteres, para fins de legenda nas páginas impressas.

Descritores: Devem ser indicados entre 3 e 10, extraídos do vocabulário "**Descritores em Ciências da Saúde (DeCS)**", nos idiomas português, espanhol e inglês, com base no **Medical Subject Headings (MeSH)**. Se não forem encontrados descritores adequados para a temática do manuscrito, poderão ser indicados termos não existentes nos conjuntos citados.

Número de figuras e tabelas: A quantidade de figuras e tabelas de cada manuscrito é limitada a cinco em conjunto. Todos os elementos gráficos ou tabulares apresentados serão identificados como *figura* ou *tabela*, e numerados seqüencialmente a partir de um, e não como *quadros*, *gráficos*, etc.

Co-autores: Identificar os co-autores do manuscrito pelo nome, sobrenome e instituição, conforme a ordem de autoria.

Financiamento da pesquisa: Se a pesquisa foi subvencionada, indicar o tipo de auxílio, o nome da agência financiadora e o respectivo número do processo.

Apresentação prévia: Tendo sido apresentado em reunião científica, indicar o nome do evento, local e ano da realização. Quando baseado em tese ou dissertação, indicar o nome do autor, título, ano, nome do programa de pós-graduação e instituição onde foi apresentada.

PREPARO DOS MANUSCRITOS

Resumo: São publicados resumos em português, espanhol e inglês. Para fins de cadastro do manuscrito, deve-se apresentar dois resumos, um na língua original do manuscrito e outro em inglês (ou em português, em caso de manuscrito apresentado em inglês). As especificações quanto ao tipo de resumo estão descritas em cada uma das **categorias de artigos**. Como regra geral, o resumo deve incluir: objetivos do estudo, principais procedimentos metodológicos (população em estudo, local e ano de realização, métodos observacionais e analíticos), principais resultados e conclusões.

Estrutura do texto:

- Introdução: Deve ser curta, relatando o contexto e a justificativa do estudo, apoiados em referências pertinentes ao objetivo do manuscrito, que deve

estar explícito no final desta parte. Não devem ser mencionados resultados ou conclusões do estudo que está sendo apresentado.

- **Métodos:** Os procedimentos adotados devem ser descritos claramente; bem como as variáveis analisadas, com a respectiva definição quando necessária e a hipótese a ser testada. Devem ser descritas a população e a amostra, instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade; e conter informações sobre a coleta e processamento de dados. Deve ser incluída a devida referência para os métodos e técnicas empregados, inclusive os métodos estatísticos; métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos, justificando as razões para seu uso e mencionando suas limitações. Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados. Os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro dos padrões éticos e aprovada por comitê de ética.
- **Resultados:** Devem ser apresentados em uma seqüência lógica, iniciando-se com a descrição dos dados mais importantes. Tabelas e figuras devem ser restritas àquelas necessárias para argumentação e a descrição dos dados no texto deve ser restrita aos mais importantes. Os gráficos devem ser utilizados para destacar os resultados mais relevantes e resumir relações complexas. Dados em gráficos e tabelas não devem ser duplicados, nem repetidos no texto. Os resultados numéricos devem especificar os métodos estatísticos utilizados na análise. Material extra ou suplementar e detalhes técnicos podem ser divulgados na versão eletrônica do artigo.
- **Discussão:** A partir dos dados obtidos e resultados alcançados, os novos e importantes aspectos observados devem ser interpretados à luz da literatura científica e das teorias existentes no campo. Argumentos e provas baseadas em comunicação de caráter pessoal ou divulgadas em documentos restritos não podem servir de apoio às argumentações do autor. Tanto as limitações do trabalho quanto suas implicações para futuras pesquisas devem ser esclarecidas. Incluir somente hipóteses e generalizações baseadas nos dados do trabalho. As conclusões devem finalizar esta parte, retomando o objetivo do trabalho.

Referências:

Listagem: As referências devem ser normalizadas de acordo com o estilo **Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication**, ordenadas alfabeticamente e numeradas. Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o Medline, e grafados no formato itálico. No caso de publicações com até seis autores, citam-se todos; acima de seis, citam-se os seis primeiros, seguidos da expressão latina “et al”. Referências de um mesmo autor devem ser organizadas em ordem cronológica crescente. Sempre que possível incluir o DOI do documentado citado, de acordo com os exemplos abaixo.

Exemplos:

Artigos de periódicos

Narvai PC. Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. *Cienc Saude Coletiva*. 2000;5(2):381-92. DOI:10.1590/S1413-81232000000200011

Zinn-Souza LC, Nagai R, Teixeira LR, Latorre MRDO, Roberts R, Cooper SP, et al. Fatores associados a sintomas depressivos em estudantes do ensino médio de São Paulo, Brasil. *Rev Saude Publica*. 2008;42(1):34-40. DOI:10.1590/S0034-89102008000100005.

Hennington EA. Acolhimento como prática interdisciplinar num programa de extensão. *Cad Saude Coletiva* [Internet].2005;21(1):256-65. Disponível em:<http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n1/28.pdf> DOI:10.1590/S0102-311X2005000100028

Livros

Nunes ED. Sobre a sociologia em saúde. São Paulo; Hucitec;1999.

Wunsch Filho V, Koifman S. Tumores malignos relacionados com o trabalho. In: Mendes R, coordenador. Patologia do trabalho. 2. ed. São Paulo: Atheneu; 2003. v.2, p. 990-1040.

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer Washington: National Academy Press; 2001[citado 2003 jul 13] Disponível em: http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10149

Para outros exemplos recomendamos consultar as normas (“Citing Medicine”) da National Library of Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=citmed>).

Referências a documentos não indexados na literatura científica mundial, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento (teses, relatórios de pesquisa, comunicações em eventos, dentre outros) e informações extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, se relevantes, devem figurar no rodapé das páginas do texto onde foram citadas.

Citação no texto: A referência deve ser indicada pelo seu número na listagem, na forma de **expoente** após a pontuação no texto, sem uso de parênteses, colchetes e similares. Nos casos em que a citação do nome do autor e ano for relevante, o número da referência deve ser colocado a seguir do nome do autor. Trabalhos com dois autores devem fazer referência aos dois autores ligados por &. Nos outros casos apresentar apenas o primeiro autor (seguido de et al. em caso de autoria múltipla).

Exemplos:

A promoção da saúde da população tem como referência o artigo de Evans & Stoddart,⁹ que considera a distribuição de renda, desenvolvimento social e reação individual na determinação dos processos de saúde-doença.

Segundo Lima et al⁹ (2006), a prevalência de transtornos mentais em estudantes de medicina é maior do que na população em geral.

Parece evidente o fracasso do movimento de saúde comunitária, artificial e distanciado do sistema de saúde predominante.^{12,15}

Tabelas

Devem ser apresentadas depois do texto, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. A cada uma deve-se atribuir um título breve, não se utilizando traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar formalmente autorização da revista que a publicou, para sua reprodução. Para composição de uma tabela legível, o número máximo é de 12 colunas, dependendo da quantidade do conteúdo de cada casela. Tabelas que não se enquadram no nosso limite de espaço gráfico podem ser publicadas na versão eletrônica. Notas em tabelas devem ser indicadas por letras, em sobrescrito e negrito. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização para sua reprodução, por escrito.

Figuras

As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos, etc.) devem ser citadas como Figuras e numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto e apresentadas após as tabelas. Devem conter título e legenda apresentados na parte inferior da figura. Só serão admitidas para publicação figuras suficientemente claras e com qualidade digital que permitam sua impressão, preferentemente no formato vetorial. No formato JPEG, a resolução mínima deve ser de 300 dpi. Não se aceitam gráficos apresentados com as linhas de grade, e os elementos (barras, círculos) não podem apresentar volume (3-D). Figuras em cores são publicadas quando for necessária à clareza da informação. Se houver figura extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização, por escrito, para sua reprodução.

DECLARAÇÕES E DOCUMENTOS

Em conformidade com as diretrizes do International Committee of Medical Journal Editors, são solicitados alguns documentos e declarações do(s) autor(es) para a avaliação de seu manuscrito. Observe a relação dos documentos abaixo e,

nos casos em que se aplique, anexe o documento ao processo. O momento em que tais documentos serão solicitados é variável:

Documento/declaração	Quem assina	Quando anexar
a. Carta de Apresentação	Todos os autores	Submissão
b. Responsabilidade pelos Agradecimentos	Autor responsável	Aprovação
c. Transferência de Direitos Autorais	Todos os autores	Aprovação

a. A Carta de Apresentação do manuscrito, assinada por todos os autores, deve conter:

- Informações sobre os achados e conclusões mais importantes do manuscrito, esclarecendo seu significado para a saúde pública.
- Se os autores têm artigos publicados na linha de pesquisa do manuscrito, mencionar até três.
- Declaração de responsabilidade de cada autor: ter contribuído substancialmente para a concepção e planejamento, ou análise e interpretação dos dados; ter contribuído significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo; e ter participado da aprovação da versão final do manuscrito. Para maiores informações sobre critérios de autoria, consulte o site da RSP.
- Declaração de potenciais conflitos de interesses dos autores. Para maiores informações, consulte o site da RSP.
- Atestar a exclusividade da submissão do manuscrito à RSP.

b. AGRADECIMENTOS

Há um campo no formulário de submissão do artigo onde devem ser mencionados os nomes de pessoas que, embora não preencham os requisitos de autoria, prestaram colaboração ao trabalho. Será preciso explicitar o motivo do agradecimento, por exemplo, consultoria científica, revisão crítica do manuscrito, coleta de dados, etc. Deve haver permissão expressa dos nomeados e o autor responsável deve anexar a Declaração de Responsabilidade pelos Agradecimentos. Também pode constar desta parte apoio logístico de instituições.

c. TRANSFERÊNCIA DE DIREITOS AUTORAIS

Todos os autores devem ler, assinar e enviar documento transferindo os direitos autorais. O artigo só será liberado para publicação quando esse documento estiver de posse da RSP .

VERIFICAÇÃO DOS ITENS EXIGIDOS

1. Nome e instituição de afiliação de cada autor, incluindo e-mail e telefone.
2. Título do manuscrito, em português e inglês, com até 90 caracteres, incluindo os espaços entre as palavras.
3. Título resumido com 45 caracteres, para fins de legenda em todas as páginas impressas.
4. Texto apresentado em letras arial, corpo 12, em formato Word ou similar (doc,txt,rtf).
5. Resumos estruturados para trabalhos originais de pesquisa em dois idiomas, um deles obrigatoriamente em inglês.
6. Resumos narrativos para manuscritos que não são de pesquisa em dois idiomas, um deles obrigatoriamente em inglês.
7. Carta de Apresentação, constando a **responsabilidade de autoria** e conflito de interesses, assinada por todos os autores.
8. Nome da agência financiadora e número(s) do processo(s).
9. No caso de artigo baseado em tese/dissertação, indicar o nome da instituição/Programa, grau e o ano de defesa.
10. Referências normalizadas segundo estilo Vancouver, ordenadas alfabeticamente pelo primeiro autor e numeradas, e se todas estão citadas no texto.
11. Tabelas numeradas seqüencialmente, com título e notas, e no máximo com 12 colunas.
12. Figura no formato vetorial ou em pdf, ou tif, ou jpeg ou bmp, com resolução mínima 300 dpi; em se tratando de gráficos, devem estar em tons de cinza, sem linhas de grade e sem volume.
13. Tabelas e figuras não devem exceder a cinco, no conjunto.

