

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

Priscilla de Bastos Souza

**ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NO INFRAVERMELHO COM
TRANSFORMADA DE FOURIER SUPERVISIONADA POR REAÇÃO EM CADEIA
DA POLIMERASE PARA DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Acanthamoeba* spp.**

Santa Cruz do Sul
2019

Priscilla de Bastos Souza

ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER SUPERVISIONADA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Acanthamoeba* spp.

Trabalho de conclusão de curso apresentado à disciplina de Trabalho de Curso II, do Curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul.

Orientador: Prof^a Dra. Danielly Joani Bullé

Co-orientador: Prof. Dr. Valeriano Antonio Corbellini

Santa Cruz do Sul
2019

RESUMO

Amebas de vida livre são protozoários distribuídos globalmente que ocorrem em ambientes com diferentes características, por possuírem a capacidade de encistamento são resistentes a ambientes considerados hostis para outros micro-organismos. Dos organismos classificados como amebas de vida livre, destaca-se o gênero *Acanthamoeba* spp. Entre as doenças causadas por esses micro-organismos são relatadas a ceratite, a meningoencefalite e a encefalite amebiana granulomatosa, que podem levar um indivíduo à morte ou a perda da visão. Nessas situações, a detecção prematura é essencial para um desfecho favorável ao paciente e para a escolha de uma estratégia terapêutica eficaz. Sendo assim, nesse estudo foram exploradas duas metodologias para análise espectroscópica baseada em Espectroscopia de Absorção Molecular no Infravermelho com transformada de Fourier destinada a caracterização morfológica de espécies de *Acanthamoeba* spp. visando a sua diferenciação. Para o ensaio em que foram utilizados fragmentos de ágar, após 90 horas de crescimento em ágar PAGE, a 30°C foi retirada a porção central do ágar. Posteriormente, as amostras foram submetidas à desidratação a 44°C por cerca de 4 horas. A seguir, cada fragmento foi posicionado sobre cristal de ATR de três maneiras diferentes para obtenção de triplicata de espectros. Na análise de suspensão celular, após 48 horas de crescimento a 30°C suspensões de células amebianas foram obtidas por lavagem com água deionizada e centrifugação (7000 rpm durante 10 minutos). O sobrenadante foi descartado. Aliquota de 1 a 2 µL do precipitado foram depositados sobre cristal de ATR e submetidos à corrente de ar quente para obtenção dos espectros. Estes foram normalizados pela amplitude (0-1) em planilha Microsoft Excel 2010 e foi realizada análise exploratória de dados por meio de Análise de Componentes Principais (PCA) em *software* Pirouette 4.0 (Infometrix) usando diferentes tipos de pré-processamento por variável (autoescalamento, centragem na média) e por amostra (1ª derivada (5 pontos)). Na análise de PCA pela metodologia de suspensão celular, foi obtido cerca de 95% de variância acumulada, utilizando dois fatores. Por outro lado, para a metodologia em ágar, este mesmo percentual foi obtido com o uso de cinco fatores. Não ocorreu a formação de agrupamentos distintos entre as duas espécies, no entanto, foi observada uma tendência à formação de conjuntos, que pode ocorrer quando aumentada a diversidade da população, em especial, pela análise da suspensão de células de *Acanthamoeba* spp. Foram definidas faixas espectrais que podem ser utilizadas na discriminação de duas espécies de *Acanthamoeba* spp e identificada metodologia promissora para sua diferenciação a partir de modelo quimiométrico.

Palavras-chave: *Acanthamoeba* spp., FT-IR, diferenciação.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	4
2 OBJETIVOS.....	6
2.1 Objetivo geral.....	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	7
3.1 Amebas de vida livre (AVL).....	7
3.2 Gênero <i>Acanthamoeba</i> spp.....	8
3.3 Gênero <i>Naegleria</i> spp.....	11
3.4 Gênero <i>Vermamoeba</i> spp.....	11
3.5 Doenças causadas por AVL.....	12
3.6 Métodos de diagnóstico molecular de AVL.....	14
3.7 Espectroscopia de Absorção Molecular no Infravermelho (FT-IR).....	17
4 METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5 CONCLUSÃO GERAL.....	31
REFERÊNCIAS.....	31

1 INTRODUÇÃO

Historicamente, amebas de vida livre se tornaram conhecidas após relatório de Puschkarew (1913) que realizou o primeiro isolamento de ameba a partir de amostra de pó e a denominou *ameba polyphagus*.

As amebas de vida livre são protozoários comuns a diferentes regiões do globo e, no decorrer dos anos atraíram atenção devido às sua capacidade de viver livremente na natureza e, eventualmente, parasitar hospedeiros e conservar-se dentro de seus tecidos sendo assim, denominadas anfizoicas (JONCKHERSE et al., 2017; PAGE, 1988). Essa característica estimulou o desenvolvimento de estudos sobre a patogenicidade desses protistas que passaram a ser considerados patógenos oportunistas. Entre as amebas reconhecidas como causadores de doenças em humanos estão espécies do gênero *Acanthamoeba* spp, *Naegleria* spp., *Vermamoeba* spp. (SCHUSTER; VISVESVARA, 2004). Representantes do gênero *Acanthamoeba* são causadores de ceratite em indivíduos saudáveis, sendo essa doença muitas vezes associada ao uso de lentes de contato, as quais favorecem a invasão do protozoário conforme a falta de higiene dos usuários (MORLET et al., 1997). Não há consenso sobre um diagnóstico ideal para essa doença, sendo descrito que uma combinação de ensaios é mais efetiva quanto a sensibilidade e especificidade do método a exemplo da identificação morfológica associada a caracterização genotípica (SCHEID; BALCZUN, 2017).

Em relação ao gênero *Naegleria*, a espécie *Naegleria fowleri* é causadora de meningoencefalite em indivíduos de diferentes faixas etárias. São observadas evidências de necrose e edema cerebral nos infectados e a doença é relacionada a hábitos recreativos em água doce e aquecida possuindo taxa de letalidade superior a 95% (COGO et al., 2004; CETIN; BLACKALL, 2012).

O gênero *Vermamoeba* contempla a espécie *Vermamoeba vermiformis*, que configura uma fonte de contaminação para pacientes imunodeprimidos, sobretudo se estiverem hospitalizados, haja vista sua presença tanto isolada como relacionada a bactérias em amostras de água de abastecimento de hospitais (PAGNIER et al., 2015). Bem como, o relato de sua presença em *swabs* oriundos de pacientes soropositivos internados (CABELLO-VÍLCHEZ et al., 2014). E surge como um potencial patógeno de fonte alimentar, uma vez que foi isolada do intestino de porcos e de peixes (MILANEZ et al., 2017; CHAVATTE et al., 2016).

Esses protozoários possuem ainda a capacidade de veicular micro-organismos tais como *Listeria monocytogenes*, *Micobacterium avium* e *Staphylococcus aureus* resistente a Metecilina (MULLER, 1990; OVRUTSKY et al., 2013; SOUZA et al., 2017). Facilitada pela

sua ampla disseminação no ambiente, as amebas de vida livre tornam – se um importante componente na propagação de doenças causadas tanto pela sua patogenicidade quanto pela de seus endossimbiontes.

Dada a relevância dos desfechos clínicos dos pacientes infectados, torna – se necessário o desenvolvimento de novas ferramentas ou o aprimoramento contínuo de técnicas que auxiliem no diagnóstico de doenças causadas por amebas de vida livre. Com isso, por meio do estudo, pretendeu-se desenvolver e padronizar uma nova técnica para dar suporte ao diagnóstico de infecções causadas por esses gêneros de ameba e, desse modo, dos micro-organismos carreados por elas.

REFERÊNCIAS

- ADL M. A. et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. v. 52, p. 399-451, 2005; (IF 2,537)
- ALSAM S. et al. Extracellular proteases of *Acanthamoeba castellanii* (encephalitis isolate belonging to T1 genotype) contribute to increased permeability in an in vitro model of the human blood–brain barrier. *Journal of Infection*. v. 51, n. 2, p. 150-156, 2005; (IF 4,603)
- AMIALI N.M. et al. Rapid identification of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by Fourier transform infrared spectroscopy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. v. 70, n. 2, p. 157-166, 2011; (IF 2,341)
- BASTOS J. L. D.; DUQUIA R. P. Um dos delineamentos mais empregados em epidemiologia: estudo transversal. *Scientia Medica*. v. 17, n. 4, p. 229-232, 2007. (B2)
- BEHERA H.S. et al. Genotyping of *Acanthamoeba* spp. and characterization of the prevalent T4 type along with T10 and unassigned genotypes from amoebic keratitis patients in India. *Journal of Medical Microbiology*. v. 65, n. 5, p. 370-376, 2016; (IF 2,112)
- BEHERA H.S.; SATPATHY G.; TRIPATHI M.. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* spp. from *Acanthamoeba* meningitis/ meningoencephalitis (AME) patients in India. *Parasites & Vectors*. v. 9, p. 442, 2016; (IF 3,163)
- BEHROZ M. et al. Contamination of swimming pools and hot tubs biofilms with *Acanthamoeba*. *Acta Parasitologica*. v. 63, n. 1, p. 147–153, 2018; (IF 0,905)
- CABELLO-VÍLCHEZ A. M. et al. Endosymbiotic *Mycobacterium chelonae* in a *Vermamoeba vermiformis* strain isolated from the nasal mucosa of an HIV patient in Lima, Perú. *Experimental Parasitology*. v. 145, sup., p. S127-S130, 2014; (IF 1,821)
- 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; (B1)
- CETIN N.; BLACKALL D.. *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Blood Journal*. v. 119, n. 16, 2012; (IF 13,146)
- CHAN, Li-Li 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; (IF 2,509)
- CHAVATTE et al. Free-living protozoa in the gastrointestinal tract and feces of pigs: Exploration of an unknown world and towards a protocol for the recovery of free-living protozoa. *Veterinary Parasitology*. v. 225, p. 91-98, 2016; (IF 2,422)
- CHIERICO F. et al. Identification and typing of free-living *Acanthamoeba* spp. by MALDITOF MS Biotyper. *Experimental Parasitology*. v. 170, p. 82-89, 2016; (IF 1,821)

- COGO P. et al. Fatal *Naegleria fowleri* Meningoencephalitis, Italy. *Emerging Infectious Disease*. v. 10, n. 10, p. 1835–1837, 2004; (IF 7,42)
- CONZA L.; PAGANI S. C.; GAIA, v. Presence of Legionella and Free-Living Amoebae in Composts and Bioaerosols from Composting Facilities. *PLoS One*. v. 8, n. 7, e68244, 2013; (IF 2,766)
- CULBERTSON C.G.;SMITH J.W.;MINNER J.R. Experimental infection of mice and monkeys by Acanthamoeba. *American Journal of Pathology*. v.35, n. 1, p. 185-197, 1959; (IF 4,069)
- DELAFONT et al. *Vermamoeba vermiformis*: a Free-Living Amoeba of Interest. *Microbial Ecology*. v. 18, n. 4, p. 991-1001, 2018; (IF 3,614)
- DELAFONT V. et al. Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water. *Water research*. v. 47, n. 19, p. 6958-6965, 2013; (IF 7,051)
- DENET E. et al. Diversity of Free-living amoebae in soils and their associated human opportunistic bacteria. *Parasitology Research*. v. 116, n. 11, p. 3151-3162, 2017; (IF 2,558)
- DERDA M. et al. Genotypic characterization of amoeba isolated from Acanthamoeba keratitis in Poland. *Parasitology Research*. v. 114, n. 3, p. 1233-1237, 2015; (IF 2,558)
- 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; (IF 2,992)
- FUERST P.A.; BOOTON G. C.; CRARY M. Phylogenetic Analysis and the Evolution of the 18S rRNA Gene Typing System of Acanthamoeba. *Journal of Eukaryot Microbiology*. v. 62, n. 1, p. 69-84, 2015; (IF 2,537)
- GOMES, T. S. et al. *Acanthamoeba* spp. in contact lenses of healthy individuals from Madrid, Spain. *PLoS One*. v. 11, n. 4, e0154246 2016; (IF 2,766)
- GREUB G.; RAOULT D. Micro-organisms Resistant to Free-Living Amoebae. *Clinical Microbiology Reviews*. V. 17, n. 2, p. 413-433, 2004; (IF 24,444)
- HAUBER, Sandra et al. The use of high-resolution 1H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy in the clinical diagnosis of Acanthamoeba. *Parasitology Research*. v. 109, n. 6, p. 1661-1669, 2011; (IF 2,558)
- HELM D.; NAUMANN D. Identification of some bacterial cell components by FT- IR spectroscopy. *FEMS Microbiology Letters*. v. 126, n. 1, p. 75-79, 1995; (IF 1,765)
- JI W.T. et al. Surveillance and evaluation of the infection risk of free-living amoebae and *Legionella* in different aquatic environments. *Science of the Total Environment*. v. 499, p. 212–219, 2014; (IF 5,156)

- JOHLER S. et al. High-resolution subtyping of *Staphylococcus aureus* strains by means of Fourier-transform infrared spectroscopy. *Systematic and Applied Microbiology*. v. 39, n. 3, p. 189-194, 2016; (IF 3,899)
- JONCKHEERE J.F. Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infection, Genetics and Evolution*. v. 11, n. 7, p. 1520-1528, 2011; (IF 2,545)
- KHEIRKHAH A. et al. Factors Influencing the Diagnostic Accuracy of Laser-Scanning In Vivo Confocal Microscopy for Acanthamoeba Keratitis. *Cornea*. v. 37, n.7, p. 818-827, 2018; (IF 2,556)
- LAMPRELL H et al. Discrimination of *Staphylococcus aureus* strains from different species of *Staphylococcus* using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology*. v. 108, n. 1, p. 125-129, 2006; (IF 3,451)
- LARES-JIMÉNEZ L.F. et al. Detection of serum antibodies in children and adolescents against *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Acanthamoeba* T4. *Experimental Parasitology*.v. 189, p. 28-33, 2018; (IF 1,821)
- LORENZO-MORALES J.; KHAN N.A.; WALOCHNIK J. An update on Acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*. v. 22, n. 10, 2015; (IF 2,042)
- MARQUES A.S. et al. Feature selection strategies for identification of *Staphylococcus aureus* recovered in blood cultures using FT-IR spectroscopy successive projections algorithm for variable selection: A case study. *Journal of Microbiological Methods*. v. 98, p. 26-30, 2014; (IF 1,701)
- MASANGKAY, Frederick. et al. *Vermamoeba vermiformis* - Global Trend and Future Perspective. *Encyclopedia of Environmental Health*. <10.1016/B978-0-12-409548-9.11005-X>;
- MATSUI, Takahiro et al. A case report of granulomatous amoebic encephalitis by Group 1 *Achantamoeba* genotype T18 diagnosed by the combination of morphological examination and genetic analysis. *Diagnostic Pathology*. v. 13, n. 27, 2018; (IF 2,396)
- MEGHA K.; KHURANA S.; SEHGAL R. Genotyping of acanthamoeba spp causing granulomatous amoebic encephalitis. *International Journal of Infectious Diseases*. V. 45, sup. 1, p. 366, 2016; (IF 3,202)
- MEWARA A. et al., Evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of Acanthamoeba keratitis. *Indian Journal of Medical Microbiology*. v. 35, n. 1, p. 90-94, 2017; (IF 1,157)

MILANEZ et al. Molecular identification of *Vermamoeba vermiformis* from freshwater fish in lake Taal, Philippines. *Experimental Parasitology*.v. 183, p. 201-206, 2017; (IF 1,821)

MILLER et al. Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *Journal of Medical Microbiology*. v. 33, n. 1, p. 51-4, 1990; (IF 2,112)

MORGAN M.J. et al. Characterization of a drinking water distribution pipeline terminally colonized by *Naegleria fowleri*. *Environmental Science and Technology*. v. 50, n. 6, p. 1001-1027, 2016; (IF 6,653)

MORLET N. et al. Incidence of acanthamoeba keratitis associated with contact lens wear. *Lancet*. v. 350 (9075):414, 1997; (IF 53,254)

MUCHESA P. et al. Free-living amoebae isolated from a hospital water system in South Africa: a potential source of nosocomial and occupational infection. *Water Science and Technology: Water Supply*. v. 16, n. 1, p. 70-78, 2015; (IF 1,247)

NIYYATI et al. Occurrence of Free-living Amoebae in Nasal Swabs of Patients of Intensive Care Unit (ICU) and Critical Care Unit (CCU) and Their Surrounding Environments . *Iranian Journal of Public Health*. v. 47, n.6, p.908-913, 2018; (IF 0,58)

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 Environmental Microbiology*. v. 79, p 3185-3192, 2013; (IF 4,31)

PAGE F.C. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria, UK. 122 pp, 1988;

PAGNIER I. et al. Isolation of *Vermamoeba vermiformis* and associated bacteria in hospital water. Microbial Pathogenesis. *Microbial Ecology*. v. 76, n. 4, p. 991-1001, 2018; (IF 3,614)

PANDA A. et al. Prevalence of *Naegleria Fowleri* in Environmental samples from the Northern Part of India. *PloS One*. v. 10, n. 10, e0137736, 2015; (IF 2,766)

PANJWANI N. Pathogenesis of *Acanthamoeba Keratitis*. *The Ocular Surface*. v. 8, n. 2, p. 70-79, 2010 (IF 5,530)

PUSHKAREW B.M. Über die Verbreitung der Süßwasser-protozoen durch die Luft Arch Protistent. v. 23, p. 323-362, 1913;

PUSSARD M.; PONS R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*, v. 8, p. 557-598, 1977; REYES-BATLLE M. et al. Unusual *Vermamoeba vermiformis* strain isolated from snow in Mount Teide, Tenerife, Canary Islands, Spain. *Novelty in Biomedicine*. v. 3, n. 4, p. 189-192, 2015; (IF 0,654)

RIDDLE J. et al. BACTERIAL IDENTIFICATION BY INFRARED SPECTROPHOTOMETRY. *Journal of Bacteriology*. v. 72, n. 5, p. 593-603, 1956; (IF 3,219)

SCHEID P. L.; BALCZUN C. Failure of molecular diagnostics of a keratitis-inducing *Acanthamoeba* strain. *Experimental Parasitology*. v. 183, p. 236-239, 2017; (IF 1,821)

SCHEID P. Relevance of free-living amoebae as hosts for phylogenetically diverse microorganisms. *Parasitology Research*. v. 113, n. 7, p. 2407-2414, 2014; (IF 2,558)

SCHUSTER F. L.; VISVESVARA G. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*. v. 34, n. 9, p. 1001-1027, 2004; (IF 3,078)

SHOBANA G. et al. Development of nanoparticle-assisted PCR assay in the rapid detection of brain-eating amoebae. *Parasitology Research*. v. 117, n.6, p. 1801–1811, 2018; (IF 2,558)

SILVA, M. A.; ROSA, J. A. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. *Rev Saúde Pública*. v. 37, n. 2, p. 242-246, 2003; (IF 1,911)

SOARES, Scheila et al. Occurrence of Infected Free-living Amoebae in Cooling Towers of Southern Brazil. *Current Microbiology*. v. 74, n. 12, p. 1461-1468, 2017; (IF 1,373)

SOUSA, Clara et al. Development of a FTIR-ATR based model for typing clinically relevant *Acinetobacter baumannii* clones belonging to ST98, ST103, ST208 and ST218. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. v. 133, p. 108-114, 2014; (IF 3,165)

SOUZA T. K. et al. Interaction Between Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Acanthamoeba polyphaga*. *Current Microbiology*. v. 74, n. 5, p. 541-549, 2017; (IF 1,373)

STIDD D. A. et al. Granulomatous Amoebic Encephalitis Caused by *Balamuthia mandrillaris* in an Immunocompetent Girl. *World Neurosurgery*. v. 78, n. 6, p. 715.e7-715.e12, 2012; (IF 1,924)

SZENTMÁRY N. et al. *Acanthamoeba* keratitis – Clinical signs, differential diagnosis and treatment. *Journal of Current Ophthalmology*. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452232518301914>. Acesso em: 03/11/18; (IF 0,419)

VAZ M. et al. Serotype discrimination of encapsulated *Streptococcus pneumoniae* strains by Fourier-transform infrared spectroscopy and chemometrics. *Journal of Microbiological Methods*. v. 93, n. 2, p. 102-107, 2013; (IF 1,701)

VISVESVARA G.S.; MOURA H.; SCHUSTER F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. v. 50, n. 1, p. 1-26, 2007; (IF 1,765)

ZHONG J. et al. Associated factors, diagnosis and management of Acanthamoeba keratitis in a referral Center in Southern China. *BMC Ophthalmology*. v. 53, n. 1, p. 273-277, 2015; (IF 1,77)