

CURSO DE FARMÁCIA

Helena Beatriz Jacobs

**IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE AMEBAS DE VIDA
LIVRE ISOLADAS EM POEIRA DE AR CONDICIONADO DE UMA UTI
PEDIÁTRICA EM UM HOSPITAL ESCOLA NO INTERIOR DO RIO GRANDE
DO SUL**

Santa Cruz do Sul
2018

Helena Beatriz Jacobs

**IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE AMEBAS DE VIDA
LIVRE ISOLADAS EM POEIRA DE AR CONDICIONADO DE UMA UTI
PEDIÁTRICA EM UM HOSPITAL ESCOLA NO 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.

Orientador: Prof^a Danielly Joani Bullé

Santa Cruz do Sul
2018

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus familiares por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em todas as minhas escolhas.

Aos meus pais Emerson e Fátima, e meu irmão Lucas, por acreditarem em mim sempre, apoiam todas as minhas decisões e me incentivando a nunca desistir dos meus sonhos.

As minhas tias Hedi e Ethel, pela amizade, amor, carinho e preocupação. Obrigada por estarem sempre comigo em todos os momentos e serem mais do que tias, mas sim mães de coração.

Ao meu namorado Eduardo, pelo amor, respeito e incentivo em todos os momentos. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

A minha professora orientadora Danielly Bullé, por todos os ensinamentos, dedicação, confiança e oportunidades. Além de minha professora, uma grande amiga. Obrigada por desde o início da minha graduação estar presente e me incentivar a ser uma pessoa e profissional melhor.

Aos meus queridos colegas do Curso de Farmácia da UNISC, por todas as experiências e aprendizados compartilhados.

Aos amigos que ganhei durante a graduação e que quero levar para vida toda, Catielle, Carolina, Martina e Silvio. Obrigada por estarem sempre por perto em toda a graduação, por cada ajuda na realização deste trabalho, por cada palavra de incentivo e por cada hora de lazer compartilhada. Vocês foram fundamentais na realização deste trabalho.

A minha querida colega Nayanna Bierhals e Valéria Leal, Responsável Técnica do TecnoUnisc, que estiveram presentes em grande parte da realização deste trabalho. Suas contribuições foram de grande importância.

E por fim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho, sempre me incentivando e torcendo para que eu chegasse aonde cheguei. Obrigada de coração.

RESUMO

As amebas de vida livre (AVL) são protozoários unicelulares, distribuídos nos mais variados habitats, capazes de sobreviver em condições extremas de temperatura e pH. Entre os principais gêneros de AVL encontram-se *Acanthamoeba* spp., *Naegleria* spp. e *Balamuthia* spp., sendo considerados potencialmente patogênicos aos seres humanos e animais, ocasionando casos graves de ceratite amebiana e meningoencefalite amebiana primária. A alimentação destas amebas ocorre através de fagocitose e é baseada principalmente em bactérias, porém, quando estas são resistentes ao processo de fagocitose as AVL podem servir de abrigo para as bactérias, incentivando a replicação destas. O objetivo do estudo foi determinar a presença de AVL em amostras de poeira de ar condicionado da UTI pediátrica de um Hospital Escola da cidade de Santa Cruz do Sul. Foram realizadas culturas monoxênicas, sendo as amostras semeadas em ágar não nutriente coberto com suspensão de *Escherichia coli* inativadas pelo calor, e incubadas por 10 dias com verificação diária de crescimento amebiano e observação no microscópio óptico para a realização do repique das amostras. A identificação morfológica foi baseada no tipo de movimento, no tamanho e características dos cistos e trofozoítos segundo Page (1988). Para a identificação de *Naegleria* spp., foi realizado o teste de exflagelação, que é específico para o gênero. Testes de osmotolerância e termotolerância foram realizados a fim de identificar o potencial patogênico das amostras isoladas. A identificação molecular foi realizada pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando iniciadores específicos para *Acanthamoeba* spp. Das 74 amostras coletadas, 67,56% foram positivas para AVL. Não houve identificação de isolados potencialmente patogênicos. O gênero identificado foi *Acanthamoeba* spp. Os isolados identificados como *Acanthamoeba* spp. foram compatíveis com o grupo II segundo os critérios de Page. As AVL isoladas não apresentaram potencial patogênico.

Palavras-chave: Poeira, Ar Condicionado, UTI Pediátrica, Hospital, *Acanthamoeba* spp.

ABSTRACT

The free-living amoebae (AVL) are unicellular protozoa, distributed in the most varied habitats, capable of surviving in extreme conditions of temperature and pH. Among the main genera of AVL are *Acanthamoeba* spp., *Naegleria* spp. and *Balamuthia* spp., being considered potentially pathogenic to humans and animals, leading to severe cases of amoebic keratitis and primary amoebic meningoencephalitis. The feeding of these amoebas occurs through phagocytosis and is mainly based on bacteria, but when these are resistant to the process of phagocytosis the AVL can be shelter for the bacteria, encouraging the replication of these. The objective of the study was to determine the presence of AVL in air conditioning dust samples from the pediatric ICU of a School Hospital in the city of Santa Cruz do Sul. Monoxenic cultures were performed, and the samples were sown on non-nutrient agar covered with *Escherichia coli* suspension and incubated for 10 days with daily verification of amoebic growth and observation under optical microscope to perform the peaks of the samples. Morphological identification was based on the type of movement, size and characteristics of cysts and trophozoites according to Page (1988). For the identification of *Naegleria* spp., The exflagellation test was performed, which is specific for the genus. Osmotolerance and thermotolerance tests were performed in order to identify the pathogenic potential of the isolated samples. Molecular identification was performed by PCR (Polymerase Chain Reaction) using specific primers for *Acanthamoeba*. Of the 74 samples collected, 67.56% were AVL positive. There was no identification of potentially pathogenic isolates. The genus identified was *Acanthamoeba* spp. The isolates identified as *Acanthamoeba* spp. were compatible with group II according to Page's criteria. Isolated AVLs had no pathogenic potential.

Key words: Dust, Air Conditioning, UTI pediatric, Hospital, *Acanthamoeba* spp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 (A) - Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> spp. observado por microscopia eletrônica; (B) - Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> spp observado por microscópio óptico.....	13
Figura 2 (A) - Cisto de <i>Acanthamoeba</i> spp. observado com microscopia eletrônica; (B) cisto de <i>Acanthamoeba</i> spp. observado com microscópio óptico.	14
Figura 3 - Classificação taxonômica das AVL.....	15
Figura 4 (A) - Cisto de <i>Acanthamoeba</i> pertencente ao grupo morfológico I em microscopia óptica; (B) - Cisto de <i>Acanthamoeba</i> pertencente ao grupo morfológico II em microscopia óptica; (C) - Cisto de <i>Acanthamoeba</i> pertencente ao grupo morfológico III em microscopia óptica.....	16
Figura 5 (A) - Trofozoíto de <i>Naegleria fowleri</i> em aumento de 1000x; (B) - Estágio flagelado de <i>N. fowleri</i> em aumento de 1000x; (C) - Cisto de <i>N. fowleri</i> em aumento de 1000x	20
Figura 6 (A) - Trofozoíto de <i>Balamuthia mandrillaris</i> em aumento de 850x; (B) - Cisto de <i>B. mandrillaris</i> em aumento de 850x.....	23
Figura 7 - Fatores de risco que contribuem para a ceratite ocasionada por <i>Acanthamoeba</i> spp.	27
Figura 8 (A) - Fusão e Vascularização da córnea de um paciente com ceratite por <i>Acanthamoeba</i> ; (B) - Dano da córnea observado em paciente com ceratite amebiana ilustrado após a aplicação de furoseína.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Porcento
°C – Graus Celsius
® - Marca Registrada
™ - Trade Mark () – Negativo (+) – Positivo
μL – Microlitros
μM – Micromolar
ATCC – *American Type Culture Collection*
AVL – Amebas de Vida Livre
CN – Controle Negativo
DNA – Ácido Desoxiribonucleico
dNTP – Desoxiribonucleotídeos Fosfatados
EAG – Encefalite Amebiana Granulomatosa
HSC – Hospital Santa Cruz
KCl – Cloreto de Potássio
M – Molar
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
mM – Milimolar
ng – Nanograma
PBS – *Phosphate buffered saline* (Tampão Fosfato Salino)
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
Pmol – Picomol
Pb – Pares de Base
Rpm – Rotações por Minuto
rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossomal
RS – Rio Grande do Sul
SNC – Sistema Nervoso Central
spp. – Espécies
Tris – Hidroximetil aminometano
U – Unidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
3 OBJETIVOS	10
3.1 Objetivo geral	10
3.2 Objetivos específico	10
4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
4.1 Amebas de Vida Livre	11
4.2 Morfologia e Taxonomia	12
4.3 Identificação e Classificação Morfológica	15
4.4 Métodos de diagnóstico para a detecção molecular de AVL	17
4.5.1 Gênero <i>Acanthamoeba</i> spp.	17
4.5.2 Gênero <i>Naegleria</i> spp.	20
4.5.3 Gênero <i>Balamuthia</i> spp.	23
4.5.4 Gênero <i>Vermamoeba</i> spp.	25
4.5.5 Gênero <i>Sappinia</i> spp.	26
4.6 Doenças causadas por Amebas de Vida Livre.....	26
4.6.1 Ceratite Amebiana	26
4.6.2 Meningoencefalite amebiana primária	30
4.7 Endossimbiontes de Amebas de Vida Livre	33
5 ARTIGO	35
6 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXOS	44
ANEXO 1: Normas da Revista Journal of Applied Microbiology	44

1 INTRODUÇÃO

As amebas de vida livre (AVL) são protozoários unicelulares que têm despertado interesse na comunidade científica, por serem considerados agentes potencialmente patogênicos capazes de ocasionar infecções graves e fatais, como meningoencefalite amebiana primária e ceratite amebiana. As AVL estão distribuídas nos mais variados habitats, como por exemplo, solo, água, poeira, piscinas e ambientes hospitalares, podendo sobreviver a condições extremas de temperatura e pH (TRABELSI et al., 2016).

Frequentemente vem sendo isoladas de amostras de água, poeiras, entre outros, AVL dos gêneros *Acanthamoeba* spp., *Naegleria* spp. e *Balamuthia* spp. sendo o gênero *Acanthamoeba* spp. o mais prevalente. Sua alimentação ocorre por fagocitose de fungos, leveduras, algas, mas principalmente de bactérias. Quando estas bactérias são resistentes ao processo de fagocitose, elas podem se multiplicar dentro da ameba, demonstrando possível patogenicidade, incentivando a transmissão destes patógenos tanto em seres humanos quanto em animais (OVRUTSKY et al., 2013).

Estas AVL são responsáveis por infecções como ceratite amebiana e meningoencefalite amebiana primária, que acometem principalmente pacientes com o sistema imune comprometido. A contaminação por estas AVL em ambiente hospitalar indica a exposição comum destes pacientes as AVL, que podem ser alvos fáceis da proliferação destes organismos (LASJERDI et al., 2011).

Diversas bactérias têm sido encontradas em associação com estes protozoários, por exemplo, *Mycobacterium avium*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, entre outras. A associação destas bactérias com as amebas as torna resistente à maioria dos processos de desinfecção em ambiente hospitalar e a diversos tratamentos de água, representando um grave problema de saúde pública (DELAFONT et al., 2016).

A presença de AVL em ambiente hospitalar mostra que as medidas de desinfecção utilizadas são insuficientes para remover estes protozoários, fazendo com que seja necessário alerta aos profissionais de saúde para que haja mais atenção aos processos de desinfecção utilizados, a fim de diminuir a presença de AVL potencialmente patogênicas que possam comprometer a saúde de pacientes hospitalizados, garantindo mais segurança ao mesmo (TRABELSI et al., 2016).

Além disso, faz - se necessário a presença de profissionais qualificados no momento do diagnóstico de infecções ocasionadas por AVL, a fim de se ter um diagnóstico precoce e correto, bem como a necessidade de medidas de prevenção e controle de infecção, uma vez que

a cada ano que passa o número de infecções ocasionados por AVL aumenta em todo o mundo, sendo então um grave problema de saúde (CASERO et al., 2017).

Baseando-se no fato de que estas amebas estão presentes no mais variados habitats, incluindo ambientes hospitalares, ocasionado graves infecções em pacientes com o sistema imune comprometido, este estudo é fundamental para a divulgação de maiores informações sobre as AVL e as doenças que estas podem ocasionar, a fim de poder auxiliar médicos a diagnosticar e tratar infecções relacionadas às amebas e conscientizar os pacientes sobre a prevenção destas infecções e os riscos que estas podem ocasionar (MUCHESA; BARNARD; BARTIE, 2015).

Devido a sua ampla dispersão no meio ambiente e a sua capacidade de carrear diversos patógenos favorecendo a sua multiplicação, este trabalho tem como propósito detectar a presença de diferentes gêneros e endossimbiontes de amebas de vida livre em poeira de ar condicionado da Unidade de Terapia Intensiva de um Hospital Escola na cidade de Santa Cruz do Sul (RS).

REFERÊNCIAS

AL-HERRAWY, A. Z., et al. Surveillance and Molecular Identification of *Acanthamoeba* and *Naegleria* Species in Two Swimming Pools in Alexandria University, Egypt. *Iranian Journal of Parasitology*. v. 12, n. 2., p. 196-205, 2017.

BAIG, A. M. Primary Amoebic Meningoencephalitis: Neurochemotaxis and Neurotropic Preferences of *Naegleria fowleri*. *ACS Chemical Neuroscience*. v. 7, p. 1026-1029, 2016.

BEATTIE, T. K., et al. Enhanced Attachment of *Acanthamoeba* to Extended-wear Silicone Hydrogel Contact Lenses. *Ophthalmology*. v.10, n.4, 2003.

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.

BOTTARI, B., et al. Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospect. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 73, n. 3, p. 485-494, 2006.

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.

CABELLO-VÍLCHEZ, A. M., et al. The isolation of *Balamuthia mandrillaris* from environmental sources from Peru. *Parasitology Research*. v. 113, n. 1, p. 2509-2513, 2014.

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.

CASERO, R. D., et al. Molecular and morphological characterization of *Acanthamoeba* isolated from corneal scrapes and contact lens wearers in Argentina. *Infection, Genetics and Evolution*. v. 54, p. 170-175, 2017.

CERMEÑO, J. R., et al. Meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*: Epidemiological study in Anzoátegui State, Venezuela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 39, n. 3, p. 264-268, 2006.

CERVANTES-SANDOVAL, I., et al. Characterization of *Naegleria fowleri* strains isolated from human cases of primary amoebic meningoencephalitis in Mexico. *Revista de Investigación Clínica*. v. 59, n. 5, p. 342-347, 2007.

CHOMBA, M., et al. A case report: primary amoebic meningoencephalitis in a young Zambian adult. *BMC Infectious Diseases*. v. 17, n. 1, 2017.

CORSARO, D., et al. Molecular identification of bacterial endosymbionts of *Sappinia* strains. *Parasitology Research*. v. 116, n. 2, p. 549-558, 2016.

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.

- CURSONS, R. T. M.; BROWN, T. J.; KEYS, E. A. Effect of Disinfectants on Pathogenic Free-Living Amoebae: in Axenic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 40, n. 1, p. 62-66, 1980.
- DART, J. K. G.; SAW, V. P. J.; KILVINGTON, S. Perspective *Acanthamoeba* Keratitis: Diagnosis and Treatment Update 2009. *American Journal of Ophthalmology*. v. 148, n. 4, p. 487-499, 2009.
- DELAFONT, V., et al. Environmental factors shaping cultured free-living amoebae and their associated bacterial community within drinking water network. *Water Research*. v. 100, p. 382-392, 2016.
- DUARTE, J. L., et al. Morphological, genotypic, and physiological characterization of *Acanthamoeba* isolates from keratitis patients and the domestic environment in Vitoria, Espírito Santo, Brazil. *Experimental Parasitology*. v. 135, p. 9-14, 2013.
- 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.
- ESSER-SCHMITZ, S., et al. Diversity of Bacterial Endosymbionts of Environmental *Acanthamoeba* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 74, n. 18, p. 5822-5831, 2008.
- FOUQUE, E., et al. Encystment of *Vermamoeba (Hartmanella) vermiformis*: Effects of environmental conditions and cell concentration. *Experimental Parasitology*. v. 145, p. 62-68, 2014.
- FUKUMOTO, T., et al. *Acanthamoeba* containing endosymbiotic *chlamydia* isolated from hospital environments and its potential role in inflammatory exacerbation. *BMC Microbiology*. v. 16, n. 1, p. 292-300, 2016.
- GARCIA, A., et al. Identification of Free-Living Amoebae and Amoeba-Associated Bacteria from Reservoirs and Water Treatment Plants by Molecular Techniques. *Environmental Science & Technology*. v. 47, n. 7, p. 3132-3140, 2013.
- HAJIALILO, E., et al. Pathogenic Free-Living Amoebae Isolated From Contact Lenses of Keratitis Patients. *Iranian Journal Parasitology*. v. 10, n. 4, p. 541-546, 2015.
- HEGGIE, T. W.; KÜPPER T. Surviving *Naegleria fowleri* infections: A successful case report and novel therapeutic approach. *Travel Medicine and Infectious Disease*. v. 16, n. 1, p. 49-51, 2016.
- ITHOI, I., et al. Detection of *Naegleria* Species in Environmental Samples from Peninsular Malaysia. *Plos One*. v. 6, n. 9, p. 1-11, 2011.
- JAROLIM, K. L., et al. A light microscopy study of the migration of *Naegleria fowleri* from the nasal submucosa to the central nervous system during the early stage of primary amebic meningoencephalitis in mice. *The Journal of Parasitology*. v. 86, n. 1, p. 49-55, 2000.
- JOSLIN, C. E., et al. The Association of Contact Lens Solution Use and *Acanthamoeba* Keratitis. *American Journal of Ophthalmology*. v. 144, n. 2, p. 169-180, 2007.

- KAO, P. M., et al. Identification and quantification of the *Acanthamoeba* species and genotypes from reservoirs in Taiwan by molecular techniques. *Acta Tropica*. v. 132, p. 45-50, 2014.
- KEMBLE, S. K., et al. Fatal *Naegleria fowleri* Infection Acquired in Minnesota: Possible Expanded Range of a Deadly Thermophilic Organism. *Clinical Infectious Diseases*. v. 54, n. 6, p. 805-809, 2012.
- KHAN, N. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews*. v.30, n.4, p. 564-595, 2006.
- KU, J. Y.; FRANZCO, F. M. C.; FRANZCO, P. B. *Acanthamoeba* keratitis cluster: an increase in *Acanthamoeba* keratitis in Australia. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. v. 37, n. 2, p. 181-190, 2009.
- LASJERDI, Z., et al. Potentially pathogenic free-living amoebae isolated from hospital wards with immunodeficient patients in Tehran, Iran. *Parasitology Research*. v. 109, p. 575-580, n. 1, 2011.
- LIM, N., et al. Comparison of Polyhexamethylene Biguanide and Chlorhexidine as Monotherapy Agents in the Treatment of *Acanthamoeba* Keratitis. *American Journal of Ophthalmology*. v. 145, n. 1, p. 130-135, 2009.
- LU, J., et al. Molecular Detection of *Legionella* spp. and their associations with *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa* and amoeba hosts in a drinking water distribution system. *Journal of Applied Microbiology*. v. 120, n. 2, p. 509-521, 2015.
- MAGHSOOD, A. H., et al. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology*. v. 54, p. 755-759, 2005.
- MAGNET, A., et al. A year long study of the presence of free living amoeba in Spain. *Water Research*. v. 47, n. 19, p. 6966-6972, 2013.
- MAJID, M. A. A., et al. Pathogenic waterborne free-living amoebae: An update from selected Southeast Asian countries. *Plos One*. v. 12, n. 5, 2017.
- MARCIANO-CABRAL, F., et al. Identification of *Naegleria fowleri* in Domestic Water Sources by Nested PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 69, n. 10, p. 5864-5869, 2003.
- MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 16, n. 2, p. 273-307, 2003.
- MARTÍN-NAVARRO, C. M., et al. The potential pathogenicity of chlorhexidine-sensitive *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens cases from asymptomatic individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Journal of Medical Microbiology*. v. 57, n. 11, p. 1399-1404, 2008.
- MASCHIO, V. J., et al. *Acanthamoeba* T4, T5 and T11 Isolated From Mineral Water Bottles in Southern Brazil. *Current Microbiology*. v. 70, n. 1, p. 6-9, 2015.

- MORALES, L. J., 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.
- MORALES, L. J.; KHAN, N. A.; WALOCHNIK, J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*. v. 22, n. 10, 2015.
- MOREIRA-RETANA, L, et al. Isolation and molecular characterization of *Acanthamoeba* and *Balamuthia mandrillaris* from combination shower units in Costa Rica. *Parasitology Research*. v. 113, n. 11, p. 4117-4122, 2014.
- MORGAN, M. J., et al. Characterization of a Drinking Water Distribution Pipeline Terminally Colonized by *Naegleria fowleri*. *Environmental Science & Technology*. v. 50, p. 2890-2898, 2016.
- MOTER, A.; GÖBEL, U. B. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. v. 41, n. 2, p. 85-112, 2000.
- MOUSSA, M., et al. Soil is the origin for the presence of *Naegleria fowleri* in the thermal recreational waters. *Parasitology Research*. v. 114, n. 1, p. 311-315, 2015.
- 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, 2015.
- MUCHESA, P., et al. Coexistence of free-living amoebae and bacteria in selected South African hospital water distribution system. *Parasitology Research*. v. 116, n. 1, p. 155-165, 2016.
- NIYYATI, M., et al. Isolation of *Balamuthia mandrillaris* from urban dust, free of known infectious involvement. *Parasitology Research*. v. 106, n.1, p. 279-281, 2009.
- NIYYATI, M.; REZAEIAN, M. Current Status of *Acanthamoeba* in Iran: A Narrative Review Article. *Iranian Journal of Parasitology*. v. 10, n. 2, p. 157-163, 2015.
- NIYYATI, M., et al. Isolation of *Balamuthia mandrillaris* from soil samples in North-Western Iran. *Parasitology Research*. v. 115, n. 1, p. 541-545, 2016.
- NIYYATI, M., et al. Morphological and Molecular Survey of *Naegleria* spp. in Water Bodies Used for Recreational Purposes in Rasht city, Northern Iran. *Iranian Journal Parasitology*. v. 10, n. 4, p. 523-529, 2015.
- 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.
- PAGE, F. C. A New Key to Freshwater and Soil Amoebae. Freshwater Biological Association Scientific Publications, Cumbria, UK. 122p, 1988.
- PAGNIER, I., et al. Isolation of *Vermamoeba vermiformis* and associated bacteria in hospital water. *Microbial Pathogenesis*. v. 80, n. 1, p. 14-20, 2015.

- PANDA, A., et al. Prevalence of *Naegleria fowleri* in Environmental Samples from Northern Part of India. *Plos One*. v. 10, n. 10, 2015.
- PHILIPS, B. C.; GOKDEN, M.; PETERSEN E. Granulomatous encephalitis due to *Balamuthia mandrillaris* is not limited to immune-compromised patients. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. v. 115, n. 1, p. 1102-1104, 2013.
- 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.
- RIVIÈRE, 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.
- SCHEIKL, U., et al. Free-living amoebae and their associated bacteria in Austrian cooling towers: a 1-year routine screening. *Parasitology Research*. v. 115, n. 1, p. 3365-3374, 2016.
- SHADRACH, W. S., et al. *Balamuthia mandrillaris*, Free-Living Ameba and Opportunistic Agent of Encephalitis, Is a Potential Host for *Legionella pneumophila* Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 71, n. 5, p. 2244-2249, 2005.
- SIDDIQUI, R.; JARROLL, E. L.; KHAN N. A. *Balamuthia mandrillaris*: Role of galactose in encystment and identification of potential inhibitory targets. *Experimental Parasitology*. v. 126, n. 1, p. 22-27, 2010.
- SIDDIQUI, R.; KHAN N. A. *Balamuthia mandrillaris*: Morphology, biology, and virulence. v. 5, n. 1, p. 15-22, 2015. *Tropical Parasitology*.
- 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.
- TEIXEIRA, L. H., et al. Prevalence of Potentially Pathogenic Free-Living Amoebae from *Acanthamoeba* and *Naegleria* Genera in Non-Hospital, Public, Internal Environments from City of Santos, Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. v. 13, n. 6, p. 395-397, 2009.
- TRABELSI, H., et al. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Pathologie Biologie*. v. 60, n. 6, p. 399-405, 2012.
- TRABELSI, H., et al. Morphological and molecular identification of free living amoeba isolated from hospital water in Tunisia. *Parasitology Research*. v. 115, p. 431-435, 2016.
- VISVEVARA, G. S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Microbiology Reviews*. v. 50, n. 1, p. 1-26, 2007.
- VISVESVARA, G. S., et al. *Paravahlkampfia francinaen* n. sp. Masquerading an Agent of Primary Amoebic Meningoencephalitis. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. v. 56, n. 4, p. 357-366, 2009.
- WALOCHNIK, J.; WYLEZICH, C.; MICHEL, R. The genus *Sappinia*: History, phylogeny and medical relevance. *Experimental Parasitology*. v. 126, n. 1, p. 4-13, 2010.

WATSON, P. M.; SORRELL, S. C.; BROWN, M. W. *Ptolemeba* n. gen., a Novel Genus of Hartmannellid Amoebae (Tubulinea, Amoebozoa); with an Emphasis on the Taxonomy of Saccamoeba. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. v. 61, n. 6, p. 611-619, 2014.

YODER, J. S., et al. The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in the USA, 1962-2008. *Epidemiology and Infection*. v. 138, n. 7, p. 968-975, 2010.

YOUSUF, F. A.; SIDDIQUI, R.; KHAN N. A. Presence of *rotavirus* and free-living amoebae in the water supplies of Karachi, Pakistan. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 59, n. 32, 2017.

