



## Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em piscinas de uso coletivo localizadas no município de Redenção, Pará, Brasil

### *Isolation of potentially pathogenic free-living amoebae in swimming pools for collective use located in the municipality of Redenção, Pará, Brazil*

Marcia Juciele da ROCHA<sup>1</sup>  0000-0002-3166-9773

Krisly Ketelhyn SOUSA<sup>1</sup>  0000-0002-1088-0510

Jhessica Lorryanny Silva CARNEIRO<sup>1</sup>  0000-0003-0826-8960

Douglas Mroginski WEBER<sup>1</sup>  0000-0003-1850-5472

## RESUMO

### Objetivo

Isolar amebas dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria* em piscinas de uso coletivo do município de Redenção, Pará, Brasil.

### Métodos

A identificação dessas amebas se deu a partir de amostras retiradas de piscinas de uso coletivo de quatro clubes da cidade. As análises foram realizadas a partir do exame direto a fresco, cultura, análise morfológica após coloração de Gram e teste de exflagelação, seguindo o protocolo descrito por Carlesso, Artuso e Rott.

<sup>1</sup> Faculdade de Ensino Superior da Amazônia Reunida, Curso de Biomedicina, Programa de Iniciação Científica. Av. Brasil, n.1435, Setor Alto Paraná, 68550-325, Redenção, Pará, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: M. J. ROCHA. E-mail: <marciajr\_15@hotmail.com>.

Como citar este artigo/How to cite this article

Rocha MJ, Sousa KK, Carneiro JLS, Weber DM. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em piscinas de uso coletivo localizadas no município de Redenção, Pará, Brasil. Rev Ciênc Med. 2022;31:e225222. <https://doi.org/10.24220/2318-0897v31e2022a5222>



## Resultados

As amebas de vida livre foram encontradas em 41,67% das amostras, com predomínio das do gênero *Acanthamoeba* (63,2%) no exame direto a fresco. No clube A, localizado no setor Serrinha, houve predominância dessas amebas em relação às demais (8,34%). As amostras obtidas por swabs apresentaram 73,69% de formas evolutivas em comparação à análise feita apenas na água das piscinas. A confirmação dos gêneros das amebas presentes nas amostras feita através da coloração de Gram encontrou um perfil de identificação diferente, sendo que nesse exame a ameba de gênero *Naegleria spp.* se sobressaiu perante a de gênero *Acanthamoeba* (61,11% e 38,89%, respectivamente).

## Conclusão

Os resultados do estudo confirmam a presença de isolados potencialmente patogênicos de amebas de vida livre em piscinas de uso coletivo, o que pode significar um risco à saúde pública.

**Palavras-chave:** *Acanthamoeba*. *Naegleria*. Piscinas.

## ABSTRACT

### Objective

To isolate amoebae of the genera *Acanthamoeba* and *Naegleria* in swimming pools for collective use in the municipality of Redenção, Pará, Brazil.

### Methods

The identification of these amoebae was determined from samples of swimming pools for collective use in four private clubs in the city. The analysis methodology was performed based on direct fresh examination, culture, morphological analysis after Gram staining and exflagellation test, following the protocol described by Carlesso, Artuso and Rott.

### Results

The frequency of free-living amoebae was 41.67%, with a predominance of the *Acanthamoeba* genus (63.2%) in direct fresh examination. At club A, located in the Serrinha sector, the frequency of these amoebae was higher than the others (8.34%). The samples obtained by swabs showed 73.69% of evolutionary forms in comparison to the analysis only of the water in the pools. The confirmation of the genera by Gram stain showed a different identification profile, in which *Naegleria spp.* stood out before the genus *Acanthamoeba* (61.11% and 38.89%, respectively).

### Conclusion

In conclusion, the results of the study confirm the presence of potentially pathogenic isolates from free-living amoebae in swimming pools for collective use that may present risks to public health.

**Keywords:** *Acanthamoeba*. *Naegleria*. Swimming pool.

## INTRODUÇÃO

As Amebas de Vida Livre (AVL), também denominadas anifzóicas, são aquelas que possuem capacidade de viver livremente no ambiente ou facultativamente como parasitas. Em geral não causam danos à saúde humana, com exceção dos gêneros *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Naegleria* e *Sappinia*, que se distribuem amplamente e podem ser isoladas em diversos ambientes como lagos, rios, piscinas, esgoto, solo, poeira e superfícies hospitalares [1]. As AVLs são resistentes às condições extremas de temperatura e pH e a tratamentos químicos, inclusive ao cloro – o que possibilita sua existência até mesmo em água tratada [2]. A maioria das pessoas que contraíram as infecções causadas por essas amebas possuem histórico de recreação ou mergulhos

em piscinas públicas, sendo que as amebas isoladas nesses locais se mostraram mais patogênicas do que as encontradas em rios e lagos [2-4].

O gênero *Acanthamoeba* é o mais comum e amplamente distribuído, sendo o agente etiológico de duas patologias quando em contato com o ser humano: a ceratite amebiana, infecção dolorosa que ameaça a visão, e a Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG), infecção rara e fatal que ataca o sistema nervoso central [5]. A ceratite amebiana acomete pessoas imunocompetentes e os principais fatores de risco são nadar em água contaminada usando lentes de contato, o uso de lentes de contato por períodos longos, trauma na córnea, enxague das lentes de contato não estéreis e formação de biofilme nas lentes de contato. Por sua vez, a EAG é uma doença oportunista que afeta hospedeiros imunocomprometidos ou debilitados, como, por exemplo, pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana, diabéticos ou submetidos a transplante de órgãos. As formas de entrada dessa ameba no hospedeiro incluem o trato respiratório inferior, lesões cutâneas e disseminação hematogênica [6].

A ameba *Naegleria fowleri* pode ser encontrada no mesmo hábitat que o gênero *Acanthamoeba*, porém podem também fazer parte da microbiota natural da cavidade oro-bucal de mamíferos. A exposição ao patógeno normalmente ocorre durante atividades recreativas na água, como natação ou mergulho, quando a água entra em contato com a cavidade nasal. Assim, a ameba infecta hospedeiros humanos penetrando a mucosa nasal e viajando do nariz para o cérebro através do nervo olfativo. A principal patologia causada por essa espécie é a Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP), caracterizada por uma doença aguda de caráter fulminante com taxa de mortalidade entre 95% e 99%. Os primeiros sintomas são cefaleia, congestionamento nasal, febre, vômitos e pescoço rígido. Com a evolução da doença, entre três ou quatro dias após a infecção, há confusão mental, convulsões, perda de equilíbrio, perda de controle corporal e coma. Após o coma há a evolução ao óbito, geralmente entre sete e dez dias após a infecção, principalmente decorrente de parada cardiorrespiratória e edema pulmonar [7].

As doenças causadas pelas AVLs têm sido diagnosticadas no Brasil, nos últimos 30 anos, através de ensaios clínicos e laboratoriais [8]. No Brasil, a primeira ocorrência de *Naegleria fowleri* foi registrada no ano de 1986 em um lago artificial no Rio de Janeiro. Além disso, é importante destacar que o Brasil é um dos países mais promissores para a dispersão de *Naegleria*, uma vez que abriga cerca de 20% da água doce global, principal hábitat dessa ameba, que pode ser encontrada em fontes naturais e artificiais [9]. Por sua vez, a associação da *Acanthamoeba sp.* com a ceratite amebiana foi citada pela primeira vez em 1988 e há relatos de casos até os dias atuais [10,11].

Dessa forma, a identificação dessas amebas em piscinas de uso coletivo poderá prestar informações importantes tanto do ponto de vista acadêmico como também para a população em geral, que terá conhecimento da presença de parasitas potencialmente patogênicos e a sua prevalência nos locais estudados. O isolamento e a identificação dessas amebas tornam-se ainda mais importantes porque essas AVLs apresentam caráter endossimbiótico, servindo de reservatório para bactérias patogênicas como *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium leprae*, *Escherichia coli*, entre outras [12].

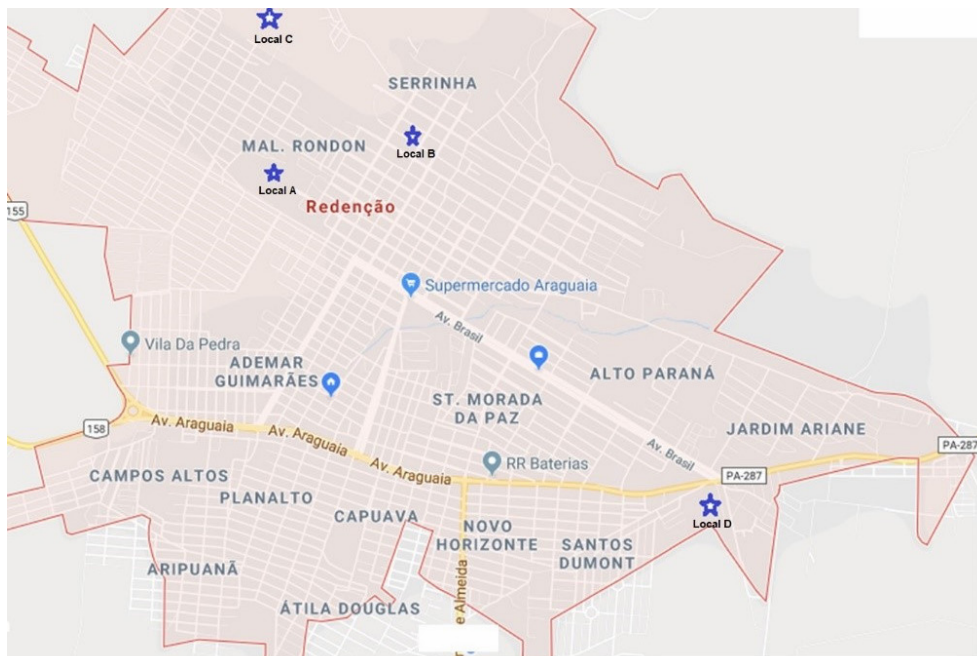
Dessa forma, o presente estudo foi realizado para detectar a presença de *Acanthamoeba spp.* e de *Naegleria spp.* em piscinas públicas comumente usadas na cidade de Redenção, no Pará, Brasil, a fim de fornecer informações de saúde pública para a população local e científica.

## MÉTODOS

Trata-se de um estudo do tipo descritivo, prospectivo e com abordagem quantitativa [13]. A pesquisa foi desenvolvida em clubes privados com piscinas de uso coletivo da cidade de Redenção, situada na região sul do Estado do Pará. A cidade apresenta uma população estimada em 84.787 habitantes e uma área de

3.823,809km<sup>2</sup>, e está localizada a uma distância de 1.018km da capital, Belém, de acordo com o último censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) [14].

A análise das amostras coletadas nos clubes foi realizada no mês de outubro de 2018 e baseou-se no estudo de Carlesso, Artuso e Rott [15]. As amostras foram obtidas em quatro clubes da cidade, localizados nos bairros Marechal Rondon, Serrinha, Zona Rural e Jardim Ariane, que foram identificados respectivamente como A, B, C e D de acordo com a ordem dos bairros citados acima (Figura 1). Esses locais foram selecionados levando-se em consideração a presença de piscinas de uso coletivo e a frequência de uso delas. O clube A contém três piscinas e os demais clubes apenas duas piscinas.



**Figura 1** – Distribuição geográfica dos pontos amostrais de piscinas de uso coletivo em Redenção (PA), Brasil, 2018.

De cada piscina foram coletadas três amostras de *swabs* nas laterais das piscinas, principalmente em lugares que continham lodo ou nos quais havia a formação de biofilmes, ao ângulo reto com profundidade de aproximadamente 2cm. Além das amostras de *swabs*, foram coletados 40mL de água em potes estéreis. Foram colhidas 27 amostras de *swabs* e nove amostras de água, atingindo um somatório de 36 amostras. Em seguida, os potes foram fechados e os *swabs* foram acondicionados em tubos contendo 3mL de solução de transporte (diluição 1:3 de solução salina e água destilada, ambas esterilizadas). O material coletado foi transportado para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ensino Superior da Amazônia Reunida (FESAR) em uma caixa isotérmica para transporte de amostras biológicas devidamente identificadas [16].

Após a coleta, foi realizado o exame direto como método de triagem para análise das amostras de *swabs* e água. A identificação das amebas baseou-se no tipo de movimento e nos critérios morfológicos dos cistos e trofozoítos segundo Page [16].

As amostras positivas de acordo com os critérios morfológicos foram separadas para a cultura. Uma alíquota de cada amostra positiva foi transferida para placas contendo o meio ágar não-nutritivo a 1,5% recoberto com uma suspensão bacteriana de *Escherichia coli* mortas pelo calor (autoclave), que serviram

de alimento para as amebas. Cada placa foi incubada em temperatura de 30°C e observada em intervalos de 24 horas durante dez dias para verificar a presença de AVL e suas formas de desenvolvimento. As áreas que possuíam cistos ou trofozoítos foram demarcadas, retiradas e transferidas para o centro de outra placa previamente preparada com ágar não nutriente para obtenção de culturas monoxênicas [15].

Para a identificação dos gêneros das amebas, as placas que apresentaram crescimento de trofozoítos sofreram raspagem do meio com adição de água deionizada. Da solução originada foram preparadas lâminas para coloração de Gram, que foram observadas em microscópio óptico na objetiva de 100x. Para isolar a *Naegleria fowleri* foi realizado o teste de exflagelação, adicionando-se uma gota do lavado de placa no centro de uma placa estéril que, posteriormente, foi incubada a 37°C. As placas foram examinadas no microscópio a cada 30 minutos durante quatro horas para verificar a emissão de flagelos. A identificação das amebas baseou-se no tipo de movimento e nos critérios morfológicos de acordo com Page [16]. Os dados foram dispostos em tabelas do Excel 2016, analisados através de estatística descritiva e dispostos em gráficos e tabelas para a apresentação dos resultados.

## RESULTADOS

O exame direto a fresco serviu como triagem para identificação de cistos ou trofozoítos das amebas (Tabela 1). Das 36 amostras de *swabs* e água coletadas dos quatro clubes recreativos, 41,67% (n=15) foram positivas para AVLS. O parque recreativo com o percentual mais alto de amostras positivas foi o local A,

**Tabela 1** – Número de amostras positivas para amebas de vida livre em piscinas de clubes recreativos e percentuais sobre o total de amostras coletadas. Redenção (PA), Brasil, 2018.

Locais	Amostras	Amostras positivas		Amostras negativas		Total				
		n	%	n	%	n	%			
Local A	Piscina adulto	<i>Swabs</i>	1	2,78	2	5,55	12	33,34		
		Água	1	2,78	-	-				
	Piscina infantil	<i>Swabs</i>	-	-	3	8,34				
		Água	1	2,78	-	-				
	Parquinho	<i>Swabs</i>	2	5,55	1	2,78				
		Água	1	2,78	-	-				
Total		6	16,67	6	16,67					
Local B	Piscina adulto	<i>Swabs</i>	1	2,78	2	5,55	8	22,22		
		Água	-	-	1	2,78				
	Piscina infantil	<i>Swabs</i>	2	5,55	1	2,78				
		Água	-	-	1	2,78				
	Total		3	8,33	5	13,89				
	Local C	Piscina adulto	<i>Swabs</i>	2	5,55	1			2,78	8
Água			1	2,78	-	-				
Piscina infantil		<i>Swabs</i>	1	2,78	2	5,55				
		Água	1	2,78	-	-				
Total		5	13,89	3	8,33					
Local D		Piscina adulto	<i>Swabs</i>	1	2,78	2	5,55	8	22,22	
	Água		-	-	1	2,78				
	Piscina infantil	<i>Swabs</i>	-	-	3	8,34				
		Água	-	-	1	2,78				
	Total		1	2,78	7	19,44				
	Total		15	41,67	21	58,33	36			100

Nota: Sinal convencional utilizado: - dado numérico igual a zero, não resultante de arredondamento; N: número absoluto dos dados; %: percentual dos dados.

localizado no setor Serrinha (n=6; 16,67%) e praticamente todas as amostras da piscina do parquinho eram positivas (n=3; 8,34%). Por outro lado, o parque localizado no Jardim Ariane obteve apenas 2,78% (n=1) de amostras positivas. Em relação às piscinas, pode-se observar que as piscinas dos adultos apresentaram o maior número de amostras positivas (n=7; 19,45%) em comparação com as piscinas infantis (n=5; 13,89%). Além disso, foram identificadas mais formas evolutivas de AVLS em amostras de swabs (27,77%) em comparação com as amostras de água (13,9%).

As AVLS foram diferenciadas morfológicamente no exame direto a fresco por suas formas evolutivas trofozoíticas e císticas em quatro categorias: trofozoítos e cistos de *Naegleria spp.* e trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba spp.* Nas 15 amostras positivas foram identificadas 19 estruturas parasitárias, sendo que a maioria eram cistos de *Acanthamoeba spp.* (n=10; 52,64%), seguidas de trofozoítos de *Naegleria spp.* (n=5; 26,32%). Nos locais A, B e C verificou-se a presença simultânea de ambos os gêneros. A prevalência de *Acanthamoeba spp.* foi de 63,16% (n=12) e de *Naegleria spp.* foi de 36,84% (n=7). Por fim, as amostras obtidas por swabs apresentaram 73,69% (n=14) de formas evolutivas de ambos os gêneros (Tabela 2).

A confirmação dos gêneros *Naegleria spp.* e *Acanthamoeba spp.* foi realizada pela coloração de Gram após cultivo em meio específico. Ao analisar o cultivo das amostras positivas com a coloração de Gram, foi possível observar que o gênero *Naegleria* (n=11; 61,11%) predominou perante o gênero *Acanthamoeba* (n=7; 38,89%), demonstrando um perfil diferente do verificado no teste de triagem. Além disso, a única amostra positiva identificada no local D pelo método a fresco não apresentou crescimento de AVLS. Porém, a presença simultânea de ambos os gêneros nos locais A e B manteve-se inalterada (Tabela 3).

**Tabela 2** – Detecção de cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba spp.* e *Naegleria spp.* em amostras coletadas em diferentes pontos das piscinas. Redenção (PA), Brasil, 2018.

Locais	Tipos de amostras	<i>Acanthamoeba spp.</i>				<i>Naegleria spp.</i>				Total	
		Trofozoítos		Cistos		Trofozoítos		Cistos		Trofozoítos	Cistos
		n	%	n	%	n	%	n	%		
Local A	Água	1	5,26	-	-	2	10,52	-	-	3	15,79
	Swabs	-	-	3	15,79	1	5,26	1	5,26	5	26,32
Local B	Água	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Swabs	1	5,26	2	10,52	1	5,26	1	5,26	5	26,32
Local C	Água	-	-	2	10,52	-	-	-	-	2	10,52
	Swabs	-	-	2	10,52	1	5,26	-	-	3	15,79
Local D	Água	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Swabs	-	-	1	5,26	-	-	-	-	1	5,26
Total		2	10,52	10	52,64	5	26,32	2	10,52	19	100

Nota: Sinal convencional utilizado: - dado numérico igual a zero, não resultante de arredondamento; N: número absoluto dos dados; %: percentual dos dados.

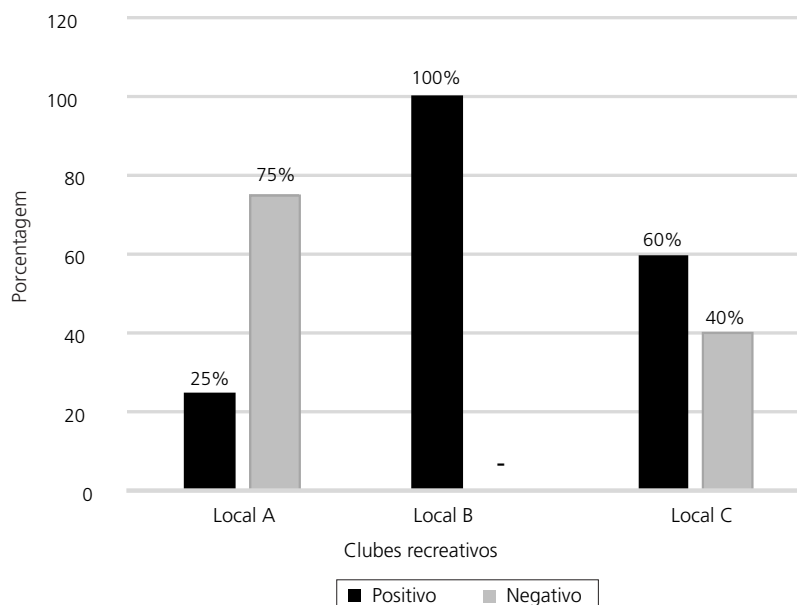
**Tabela 3** – Isolados de *Acanthamoeba spp.* e *Naegleria spp.* de culturas em ágar não nutriente de água e swabs de piscinas de clubes recreativos. Redenção (PA), Brasil, 2018

Locais	Número de isolados sugestivos de <i>Acanthamoeba sp.</i>		Número de isolados sugestivos de <i>Naegleria sp.</i>		Total	
	n	%	n	%	n	%
Local A	4	22,22	4	22,22	8	44,44
Local B	3	16,67	2	11,11	5	27,78
Local C	-	-	5	27,78	5	27,78
Local D	-	-	-	-	-	-
Total	7	38,89	11	61,11	18	100,00

Nota: Sinal convencional utilizado: - dado numérico igual a zero, não resultante de arredondamento; N: número absoluto dos dados; %: percentual dos dados.

Para confirmar a presença da espécie *Naegleria fowleri* foi realizado o teste de exflagelação com todas as amostras positivas na coloração de Gram. As amostras derivadas do local B demonstraram, em sua totalidade, formas amebianas produtoras de flagelos e de movimento rápido e desordenado, característicos da espécie em questão. Os demais locais apresentaram também a presença dessa espécie associada a outras do gênero. Os resultados do teste de exflagelação estão dispostos na Figura 2.

Além disso, foi constatado que os quatro locais seguem a norma técnica 10818 (NBR 10818 – NB1219) de 01/2016, que determina as condições segundo as quais a água da piscina deve ser tratada para garantir sua qualidade, e que a desinfecção é realizada mensalmente [17].



**Figura 2** – Avaliação da capacidade de exflagelação de trofozoítos de *Naegleria fowleri*. Redenção (PA), Brasil, 2018.

Nota: Sinais convencionais utilizados: - Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento; % porcentagem.

## DISCUSSÃO

As AVLs são habitantes normais de fontes de água doce e solos e a sobrevivência desse grupo depende de parâmetros físico-químicos, flutuação anual de temperaturas e mudanças de pH. Porém, elas também podem colonizar sistemas de água domésticos e institucionais escapando do sistema de desinfecção da água. Assim, essas amebas podem estar presentes em vários sistemas de águas, como torneiras domésticas, redes de água hospitalares, piscinas, banhos de hidroterapia, estações de lavagem ocular e torres de resfriamento [18]. Não obstante a desses achados, o presente estudo demonstrou uma positividade significativa (41,67%) nas amostras de piscinas analisadas na região sudeste do Pará.

Foi observado no trabalho que todos os locais apresentaram positividade para as AVLs, porém o parque A apresentou uma taxa superior de contaminação perante os demais. Além disso, os membros das AVLs foram isolados em diferentes amostras, principalmente nas piscinas para adultos e provenientes de swabs com possível formação de biofilmes. Esses locais são possíveis fontes de contaminação para os seres humanos, visto que essas amebas apresentam um importante papel como patógeno e como reservatórios de

vários microrganismos patogênicos como bactérias, fungos e vírus [19,20]. Esses microrganismos resistentes às amebas encontram o interior amebiano como um ambiente favorável, pois são facilmente protegidos da ação de antimicrobianos e de substâncias biocidas, em especial quando as amebas estão encistadas. Dessa forma, as amebas funcionam como reservatório e veículo desses microrganismos, permitindo a persistência e distribuição desses no ambiente [5,20].

Os biofilmes são formados geralmente na interface ar-água e na linha de água em contato com uma substância sólida. Nesses casos, esse tipo de biofilme desempenha um papel importante na contaminação da água, pois oferece às AVLS uma fonte de nutrientes bacterianos, bem como proteção física e química contra os desinfetantes [21,22]. No estudo de Poor *et al.* [21], 15% dos biofilmes foram positivos para o gênero *Acanthamoeba*, indicando a possibilidade de recontaminação da água mesmo que tenha sido desinfetada com eficiência. Além disso, Puzon *et al.* [22] constataram que todas as amostras de biofilme coletadas (n=5) em seu estudo foram positivas para amebas viáveis, sendo que em 40% das amostras foi possível identificar a espécie *Naegleria fowleri*.

Além disso, outro achado interessante está relacionado à identificação superior de cistos de *Acanthamoeba spp.* (52,64%) em relação ao gênero *Naegleria* (10,5%) no exame direto a fresco. Dados semelhantes foram encontrados em outras regiões do Brasil: no Rio Grande do Sul [23] constatou-se uma predominância dos cistos do gênero *Acanthamoeba* ao analisar água de piscina e em Brasília [24] foi demonstrado uma distribuição generalizada desse gênero em diferentes fontes ambientais, revelando um risco potencial de infecção humana e a necessidade de medidas preventivas eficazes. A *Acanthamoeba spp.* é considerada o agente causador de lesões cutâneas e infecções sinusal, ceratite amebiana e EAG, que é potencialmente fatal [25,26]. Além disso, é também tida como o cavalo de Tróia do mundo microbiológico, pois carrega vírus, bactérias e fungos [27].

Não obstante, a presença de *Acanthamoeba sp.* em águas de piscinas é relatada em diferentes países do mundo [28-30]. Em Taiwan foi identificado 21,2% de amebas do gênero *Acanthamoeba* em amostras de águas termais, piscinas de hidromassagem e de calhas, e no Chile o resultado foi positivo para o gênero em 71% das amostras de água e em 29% de amostras de ar-condicionado do Instituto de Saúde Pública em Santiago [26,31]. Isso ocorre devido aos cistos de *Acanthamoeba spp.* serem mais resistentes a várias condições ambientais como dessecação, altas temperaturas, osmolaridade, cloração da água ou desinfecção insuficiente e às limpezas das instalações [32]. Vale ressaltar que essas AVLS são mais frequentemente isoladas em amostras de água, que são ricas em fontes de nutrientes para o desenvolvimento dessas amebas [31].

No que diz respeito à *Naegleria spp.*, o presente estudo encontrou uma predominância do gênero na cultura (61,11%) em relação ao exame direto a fresco (36,8%). Esse número de amostras positivas para o gênero *Naegleria* desperta interesse e preocupação, pois a MAP, causada pela AVL, possui caráter fulminante e um período de incubação extremamente curto [33]. Além disso, segundo a literatura, os cistos de *Naegleria*, quando comparados aos cistos de *Acanthamoeba*, são menos resistentes a constantes desinfecções e dessecações, explicando a sua prevalência em locais úmidos, como os locais pesquisados no estudo, e que são desinfetados com pouca frequência [26].

Os locais estudados seguem a norma regulamentadora (NR) 10818 (NB1219) de 01/2016, que estabelece os requisitos mínimos para que a qualidade da água de piscina garanta sua utilização de maneira segura, sem causar prejuízo à saúde e ao bem-estar do usuário [17]. A norma determina que a superfície da água deve estar livre de matérias flutuantes e que o fundo da piscina deve estar livre de detritos. O pH da água deve ser mantido entre 7,2 e 7,8 e a concentração de cloro na água da piscina deve ser mantida entre 0,8mg/L e 3,0mg/L de cloro livre. Estudos anteriores demonstraram que 0,79mg/L foram suficientes para eliminar a *Naegleria spp.*, enquanto para eliminar a *Acanthamoeba spp.* é necessário 1,25 mg/L de cloro [26]. A presença



de ambas AVLs e a sobreposição de *Naegleria spp.* em relação à *Acanthamoeba spp.* pode estar associada à presença de biofilmes e de matéria orgânica nas piscinas, que reage com o cloro diminuindo sua eficácia ou atrasando o início de seu efeito sobre esses microrganismos [34].

O estudo realizado por Miller *et al.* [34] demonstrou que aumentar a concentração de cloro acima dos níveis recomendados (1,3mg/L) reduziu a contagem de células presentes no biofilme e eliminou a presença de *Naegleria fowleri* e de outras amebas na água após 60 dias de uso constante. Além disso, observou-se que não apenas as amebas já estabelecidas no biofilme foram eliminadas, como também a recolonização de *Naegleria fowleri* nesse local foi evitada. A forma cística da ameba, no entanto, não foi eliminada ainda que a concentração de cloro tenha aumentado. Vale destacar que Dupuy *et al.* [35] afirmam que os cistos de *Acanthamoeba spp.* são significativamente mais resistentes ao cloro e a outros desinfetantes (monocloramina e dióxido de cloro) em relação ao cisto de *Naegleria spp.* Além disso, a associação de biofilme com essas amebas aumenta a resistência a diversos desinfetantes, justificando a presença de ambas as amebas no presente estudo [34].

As amebas *Acanthamoeba spp.* e *Naegleria spp.* podem ser facilmente cultivadas em laboratório utilizando ágar não nutriente revestido por bactérias, como *Escherichia coli* ou *Enterobacter aerogenes*. Dessa forma, elas se alimentam e se multiplicam cobrindo a superfície das placas em poucos dias [36]. A espécie *Naegleria fowleri* pode crescer em temperaturas de até 45°C, resistindo bem a altas temperaturas, porém sua presença correlaciona-se com a origem geográfica, desenvolvendo-se bem em climas tropicais [7]. Geralmente, os isolados de *Acanthamoeba spp.* apresentam características distintas de crescimento quando analisado seu grau de virulência. As cepas mais virulentas apresentam altas taxas de crescimento, toleram bem temperaturas elevadas (37°C-42°C) e efeitos citopáticos elevados. Porém, algumas cepas menos virulentas crescem apenas moderadamente, preferencialmente em temperaturas mais baixas, dificultando seu isolamento e identificação [32]. Logo, a identificação superior de *Naegleria spp.* (61,11%) em relação ao isolamento de *Acanthamoeba spp.* (38,89%) por cultivo no presente estudo pode ter sido influenciada por esses motivos citados.

Ao realizar o teste de exflagelação foi possível observar que dos quatro locais com crescimento de *Naegleria spp.*, três apresentaram positividade para a formação de flagelos, sugerindo a presença da espécie *Naegleria fowleri*. Dentre as 47 espécies do gênero *Naegleria*, apenas a espécie *Naegleria fowleri* é considerada um patógeno humano e a sua presença em piscinas de uso público mostra via de transmissão para a população local [37]. Um estudo realizado na Costa Rica do ano de 2020 identificou a relação de *Naegleria fowleri* com dois casos de MAP através do teste de exflagelação e confirmação com Reação de Cadeia em Polimerase (PCR) e sequenciamento [38].

Essa metodologia de identificação de *Naegleria fowleri* (cultura e teste de exflagelação), no entanto, não é confiável o suficiente para confirmar a sua presença. Testes mais sensíveis, como PCR ou ELISA, são mais eficazes e podem reduzir a subestimação da presença e concentração dessas amebas [39]. O estudo realizado por Behets *et al.* [39] deixa evidente que resultados negativos de alguns testes de exflagelação para essas amebas são, na verdade, falsos negativos, pois ao realizar RCP ou ELISA é confirmada a presença do gênero ou até mesmo da espécie *Naegleria fowleri*.

## CONCLUSÃO

As AVLs foram detectadas em 41,67% das amostras de água e swabs coletados em piscinas de uso coletivo, confirmando a ampla distribuição dessas amebas e os riscos associados à contaminação dos usuários desses locais. A caracterização dos isolados pelo exame direto demonstrou uma sobreposição do gênero

*Acanthamoeba* (63,2%) em relação à *Naegleria spp.* (36,8%), porém a confirmação pela coloração de Gram após a cultura mostrou um perfil diferente (38,89% e 61,11%, respectivamente). A presença dessas AVLs pode estar relacionada à formação de biofilmes, o que diminui a eficácia da ação do cloro ou atrasa o início de seu efeito sobre os microrganismos. Mais testes são necessários para determinar a espécie e a patogenicidade desses isolados a fim de avaliar os riscos apresentados por *Naegleria spp.* e *Acanthamoeba spp.* aos usuários das piscinas no município de Redenção, Pará, Brasil.

## REFERÊNCIAS

1. Gomes TS, Vaccaro L, Manget A, Izquierdo F, Ollero D, Martínez-Fernández C, *et al.* Presence and interaction of free-living amoebae and amoeba-resisting bacteria in water from drinking water treatment plants. *Sci Total Environ.* 2020;719:137080. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137080>
2. Farra A, Bekondi C, Tricou V, Mbecko JR, Talarmin A. Free-living amoebae isolated in the Central African Republic: Epidemiological and molecular aspects. *Pan Afr Med J.* 2017;26(57):1-10. <https://doi.org/10.11604/pamj.2017.26.57.9021>
3. Dobrowsky PH, Khan S, Cloete TE, Khan W. Molecular detection of *Acanthamoeba spp.*, *Naegleria fowleri* and *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis* as vectors for *Legionella spp.* in untreated and solar pasteurized harvested rainwater. *Parasit Vectors.* 2016;9(539):1-13. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1829-2>
4. Heggie TW, Kupper T. Surviving *Naegleria fowleri* infections: a successful case report and novel therapeutic approach. *Travel Med Infect Dis.* 2017;16(1):49-51. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.12.005>
5. Guimaraes AJ, Gomes KX, Cortines JR, Peralta JM, Peralta RH. *Acanthamoeba spp.* as a universal host for pathogenic microorganisms: one bridge from environment to host virulence. *Microbiol Res.* 2016;193(1):30-8. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.08.001>
6. Shing B, Balen M, McKerrow JH, Debnath A. *Acanthamoeba* Keratitis: an update on amebicidal and cysticidal drug screening methodologies and potential treatment with azole drugs. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2021;19:1-15. <https://doi.org/10.1080/14787210.2021.1924673>
7. Stahl LM, Olson JB. Environmental abiotic and biotic factors affecting the distribution and abundance of *Naegleria fowleri*. *FEMS Microbiol Ecol.* 2020;97(1):fiaa238. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa238>
8. Juárez MM, Tártara LI, Cid AG, Real JP, Bermúdez JM, Rajal VB, *et al.* *Acanthamoeba* in the eye, can the parasite hide even more? Latest developments on the disease. *Cont Lens Anterior Eye.* 2017;41(3):245-51. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2017.12.017>
9. Bellini NK, Fonseca ALM, Reyes-Battle M, Lorenzo-Morales J, Rocha O, Thiemann OH. Isolation of *Naegleria spp.* from a Brazilian Water Source. *Pathogens.* 2020;9(2):90. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020090>
10. Carvalho FRS, Foronda AS, Mannis MJ, Höfling-Lima AL, Belfort R, Freitas D. Twenty years of *Acanthamoeba* keratitis. *cornea.* 2009;28(5):516-9. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e318193e0fe>
11. Alves DSMM, Gonçalves GS, Moraes AS, Alves LM, Neto JRC, Hecht MM, *et al.* The first *Acanthamoeba* keratitis case in the Midwest region of Brazil: diagnosis, genotyping of the parasite and disease outcome. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2018;51(5):716-9. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0010-2018>
12. Gomes TS, Vaccaro L, Magnet A, Izquierdo F, Ollero D, Martínez-Fernández C, *et al.* Presence and interaction of free-living amoebae and amoeba-resisting bacteria in water from drinking water treatment plants. *Sci Environ.* 2020;719:137080. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137080>
13. Barufii H. Metodologia de pesquisa: orientações metodológicas para a elaboração de monografia. 4. ed. Dourados: Hbedit; 2004.
14. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades@: Pará. Rio de Janeiro: Instituto; 2015 [citado 2019 Set 08]. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pa/redencao/panorama>
15. Carlesso AM, Artuso GL, Caumo K, Rott MB. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. *Curr Microbiol.* 2010;60(3):185-90. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9523-7>
16. Page FC. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *J Protozool.* 1967;14(4):709-24. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1967.tb02066.x>

17. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 9.816: Piscina: Terminologia. Rio de Janeiro, 1987. NBR 10.818: Qualidade da água de piscina: Procedimento. Rio de Janeiro: Associação; 2016 [citado 2019 Set 08]. Disponível em: <https://www.target.com.br/produtos/normas-tecnicas/27597/nbr10818-qualidade-da-agua-de-piscina-procedimento>
18. Balczun C, Scheid PL. Free-Living amoebae as hosts for and vectors of intracellular microorganisms with public health significance. *Viruses*. 2017;9(4):65. <https://doi.org/10.3390/v9040065>
19. Denet E, Coupât-Goutaland B, Nazaret S, Pélandakis M, Favre-Bonté S. Diversity of free-living amoebae in soils and their associated human opportunistic bacteria. *Parasitol Res*. 2017; 116(11):3151-62. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5632-6>
20. Strassmann JE, Shu L. Ancient bacteria-amoeba relationships and pathogenic animal bacteria. *Plos Biol*. 2017;15(5):e2002460. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002460>
21. Poor BM, Dalimi A, Ghafarifar F, Khoshzaban F, Abdolalizadeh J. Contamination of swimming pools and hot tubs biofilms with *Acanthamoeba*. *Acta Parasitol*. 2018;63(1):147-53. <https://doi.org/10.1515/ap-2018-0016>
22. Puzon GJ, Wylie JT, Walsh T, Braun K, Morgan MJ. Comparison of biofilm ecology supporting growth of individual *Naegleria* species in a drinking water distribution system. *FEMS Microbiol Ecol*. 2017;93(4):1-8. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix017>
23. Caumo K, Frasson AP, Pens CJ, Panatieri LF, Frazzon APG, Rott MB. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. *Annals Tropical Med Parasitology*. 2009;03(6):477-85. <https://doi.org/10.1179/136485909X451825>
24. Alves DSMM, Moraes AS, Nitz N, Oliveira MGC, Hecht MM, Gurgel-Gonçalves R, et al. Occurrence and characterization of *Acanthamoeba* similar to genotypes T4, T5, and T2/T6 isolated from environmental sources in Brasília, Federal District, Brazil. *Exp Parasitol*. 2012;131(2):239-44. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.04.011>
25. Taravaud A, Fechtali-Moute Z, Loiseau PM, Pomel S. Drugs used for the treatment of cerebral and disseminated infections caused by free-living amoebae. *Clin Transl Sci*. 2021;1-15. <https://doi.org/10.1111/cts.12955>
26. Huang SW, Hsu BM. Isolation and identification of *Acanthamoeba* from Taiwan spring recreation areas using culture enrichment combined with PCR. *Acta Tropica*. 2010;115(3):282-7. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.04.012>
27. Mavridou A, Pappa O, Papatzitz O, Dioli C, Kefala AM, Drossos P, et al. Exotic tourist destinations and transmission of infections by swimming pools and hot springs: a literature review. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(12):2730. <https://doi.org/10.3390/ijerph15122730>
28. Vijayakumar R. Isolation, identification of pathogenic *Acanthamoeba* from drinking and recreational water sources in Saudi Arabia. *J Adv Vet Anim Res*. 2018;5(4):439-44. <https://doi.org/10.5455/javar.2018.e296>
29. Esboei BR, Fakhar M, Saberi R, Barati R, Moslemi M, Hassannia H, et al. Genotyping and phylogenetic study of *Acanthamoeba* isolates from human keratitis and swimming pool water samples in Iran. *Parasite Epidemiol Control*. 2020;11:e00164. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00164>
30. Reyes-Battle M, Gabriel MF, Rodríguez-Expósito R, Felgueras F, Sifaoui I, Mourão Z, et al. Evaluation of the occurrence of pathogenic free-living amoeba and bacteria in 20 public indoor swimming pool facilities. *Microbiologyopen*. 2021;10(1):e1159. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1159>
31. Astorga B, Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, Alarcón V, Moreno J, González AC, et al. *Acanthamoeba* belonging to T3, T4, and T11: genotypes isolated from air-conditioning units in Santiago, Chile. *J Eukaryot Microbiol*. 2011;58(6):542-4. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2011.00584.x>
32. Possamai CO, Loss AC, Costa AO, Falqueto A, Cinthia F. *Acanthamoeba* of three morphological groups and distinct genotypes exhibit variable and weakly inter-related physiological properties. *Parasitol Res*. 2018;177:1389-400. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5824-8>
33. Tillery L, Barrett K, Goldstein J, Lassner JW, Osterhout B, Tran NL, et al. *Naegleria fowleri*: protein structures to facilitate drug discovery for the deadly, pathogenic free-living amoeba. *Plos One*. 2021;16(3):e0241738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241738>
34. Miller HC, Wylie J, Dejean G, Kaksonen AH, Sutton D, Braun K, et al. Reduced efficiency of chlorine disinfection of *Naegleria fowleri* in a drinking water distribution biofilm. *Environ Sci Technol*. 2015;49(18):11125-31. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02947>
35. Dupuy M, Berne F, Herbelin P, Binet M, Berthelot N, Rodier MH, et al. Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants. *Int J Hygiene Environ Health*. 2014;217(2-3):335-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.07.007>

36. Visvesvara GS. Infections with free-living amebae. *Handb Clin Neurol.* 2013;114:153-68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00010-8>
37. Saberi R, Seifi Z, Dodangeh S, Najafi A, Abdollah Hosseini S, Anvari D, *et al.* A systematic literature review and meta-analysis on the global prevalence of *Naegleria* spp. in water sources. *Transbound Emerg Dis.* 2020;67(6):2389-402. <https://doi.org/10.1111/tbed.13635>
38. Moreira LR, Rojas LZ, Murillo MG, Castro SEM, Sandí EA. Primary amebic meningoencephalitis related to groundwater in Costa Rica: diagnostic confirmation of three cases and environmental investigation. *Pathogens.* 2020;9(8):629-37. <https://doi.org/10.3390/pathogens9080629>
39. Behets J, Seghi F, Declerck P, Verelst L, Duvivier L, Damme AV, *et al.* Detection of *Naegleria* spp. and *Naegleria fowleri*: a comparison of flagellation tests, ELISA and PCR. *Water Sci Technol.* 2003;47(3):117-22. <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0177>

Recebido em: 18 janeiro, 2021

Versão final: 15 junho, 2021

Aprovado: 22 julho, 2021