

Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes de hospital público da Cidade de Porto Alegre, RS

Isolation and identification of potentially pathogenic free-living amoebae in samples from environments in a public hospital in the City of Porto Alegre, Rio Grande do Sul

Ana Maris Carlesso^{1,2}, Amauri Braga Simonetti³, Geórgia Lazzari Artuso³
e Marilise Brittes Rott³

RESUMO

Um estudo sobre a presença de amebas de vida livre em um hospital público foi desenvolvido na Cidade de Porto Alegre, RS. Poeira e biofilmes de 15 ambientes hospitalares, incluindo CTI, UTI pediátrica, cozinha, emergência, centro cirúrgico ambulatorial e centro cirúrgico, reservatórios de água, torneira e 6 bebedouros coletivos foram coletados mensalmente, de julho de 2004 a março de 2005, usando-se swabes estéreis, preparados para a pesquisa. As AVL foram isoladas em cultivo, utilizando-se meio de ágar não nutriente adicionado de *Escherichia coli*, mortas pelo calor. A identificação dos protozoários foi feita pela observação morfológica de cistos e trofozoítos, segundo critérios morfológicos de Page (1988). Das 135 amostras coletadas dos 15 ambientes estudados, 47 (35%) foram positivas para AVL. Destas, 34% apresentaram características morfológicas próprias do gênero *Acanthamoeba*.

Palavras-chaves: Amebas de vida livre. Poeira. Biofilmes. Ambiente hospitalar. *Acanthamoeba*.

ABSTRACT

A study on the presence of free-living amoebae in a public hospital was developed in the city of Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul. Dust and biofilms were collected using sterile swabs that had been prepared for this study, from 15 hospital environments, including the intensive care center, pediatric intensive care unit, kitchen, emergency room, outpatient surgical center, clinical surgical center, water storage tanks, taps and six drinking fountains for general use, every month from July 2004 to March 2005. The FLAs were isolated by culturing, using non-nutrient agar medium with the addition of heat-killed *Escherichia coli*. The protozoa were identified by morphological observation of cysts and trophozoites, in accordance with Page's morphological criteria (1988). Among the 135 samples collected from the 15 environments, 47 (35%) were positive for FLAs. Of these, thirty-four percent presented morphological characteristics particular to the genus *Acanthamoeba*.

Key-words: Free-living amoebae. Dust. Biofilm. Hospital environment. *Acanthamoeba*.

As amebas de vida livre (AVL), que esporadicamente parasitam o homem, são protozoários com ampla dispersão ambiental, isoladas em lagos, rios, piscinas, solos, esgotos e cursos de água que recebem efluentes industriais, estando presente em todos os continentes e climas^{1 4 9 13 16 21 24 25 27 34}. Também, são encontradas em água para consumo humano, descargas termais, equipamentos lava-olhos, encanamentos de equipo odontológico e unidades de hemodiálise^{3 5 25 26 30}.

As três principais AVL potencialmente patogênicas para o homem e animais são: *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp e *Balamuthia mandrillaris*, as quais têm sido relacionadas com meningoencefalites, ulcerações da pele e infecções da córnea.

Naegleria fowleri a única espécie que causa em humanos a meningoencefalite amebiana primária (MAP), uma infecção não-opportunística, mas de curso rápido e fatal. Geralmente acomete crianças e jovens saudáveis com histórias de terem nadado dias antes em lagos ou piscinas^{1 4 10 18 29 31 33 36}. *Acanthamoeba* spp e *Balamuthia mandrillaris* podem causar encefalite amebiana granulomatosa (EAG), uma infecção considerada oportunista, pois quase todos os casos relatados até o momento se referem a indivíduos imunologicamente debilitados, especialmente àqueles que sofreram algum tipo de terapia ou situação imunossupressora, como alcoolismo, gravidez, quimioterapia ou uso de antibióticos de amplo espectro. Mais recentemente, vêm sendo descritos casos

1. Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS. 3. Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. Financiado pelo CNPq.

Endereço para correspondência: Dra. Ana Maris Carlesso. Av. João Pessoa 721/607, 90040-000 Porto Alegre, RS.

Tel: 55 51 3286-6361

e-mail: anacarlesso@yahoo.com.br; marilise.rott@ufrgs.br

Recebido para publicação em 3/7/2006

Aceito em 2/5/2007

de infecção por *Acanthamoeba* spp. e *Balamuthia mandrillaris* em pacientes com AIDS^{26 15 19 22 29 31}. A ceratite por *Acanthamoeba* tem se mostrado como um crescente problema no campo da oftalmologia, ocorrendo principalmente em usuários de lentes de contato, embora dados recentes indiquem que possa estar associada com outras condições predisponentes. O diagnóstico desta ameba na superfície ocular é freqüentemente difícil de ser realizado, pois sua apresentação pode mimetizar ceratite herpética ou bacteriana. O atraso no diagnóstico pode ser extremamente prejudicial ao paciente, conduzindo ao agravamento do quadro podendo culminar até mesmo em enucleação^{11 14 15 17 37}. Assim, o encontro de AVL potencialmente patogênicas em amostras ambientais às quais o ser humano se expõe com freqüência, é de grande interesse para determinação de riscos, decorrente dessa exposição. AVL em ambientes hospitalares se mostram como possíveis fontes de infecções aos seres humanos^{1 6 25 26}. Tem sido demonstrada a resistência dos seus cistos a desinfetantes, como o cloro, dióxido de cloro, ozônio, deciquam 222 entre outros, dificultando assim a desinfecção de ambientes contaminados. Além disso, as AVL resistem a condições extremas de temperatura e pH^{7 15 26 30}. O gênero *Acanthamoeba*, também tem sido implicado como veículo de várias bactérias patogênicas, como por exemplo, a *Legionella* spp., entre outros endossimbiontes^{20 29 31}. No Brasil, os poucos trabalhos realizados até o momento são insuficientes para demonstrar a real importância das amebas de vida livre como possíveis agentes patogênicos, principalmente em ambientes hospitalares. Baseado no exposto, realizou-se estudo com o objetivo de verificar a ocorrência de AVLs no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, avaliando-se a poeira de diversos ambientes hospitalares, além dos biofilmes de reservatórios e bebedouros coletivos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 135 amostras de poeira e biofilmes entre os meses de julho de 2004 e março de 2005 em 15 ambientes (Centro de Terapia Intensiva, Centro Cirúrgico, UTI Pediátrica, Cozinha, Emergência, Centro Cirúrgico Ambulatorial, 02 Reservatórios, seis Bebedouros coletivos e uma torneira da cozinha) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS (HCPA). As amostras dos ambientes selecionados foram coletadas com suabes esterilizados e secos, que foram passados de forma aleatória sobre locais das áreas escolhidas, como o piso, janelas, móveis, biofilme de bebedouros coletivos, da torneira e dos reservatórios de água. As amostras foram processadas segundo Silva & Rosa³¹. Para o isolamento das amebas, foi utilizado o meio de ágar não-nutritivo^{23 28} 1,5% recoberto com uma suspensão de *Escherichia coli*, mortas pelo calor. A seguir as placas foram seladas com Parafilm® e incubadas a 30°C por até 10 dias. A verificação do crescimento amebiano foi realizada diariamente colocando-se a placa invertida sobre a platina de um microscópio óptico usando a objetiva de 10X. A identificação das amebas baseou-se no tipo de movimento e nos critérios morfológicos dos cistos e trofozoítos segundo Page (1988)²³. A identificação de *Naegleria fowleri* foi realizada através da técnica de exflagelação e confirmada em triplicata. Após o

crescimento de trofozoítos, a superfície das placas de ágar não-nutritivo foi coberta com 10mL de água destilada estéril e raspada cuidadosamente com alça de platina. O líquido foi colocado em garrafas estéreis de cultivo (25cm³) que foram incubadas a 37°C. As garrafas foram examinadas em microscópio invertido para verificar a emissão de flagelos a cada 30 min durante 4 horas. As amostras negativas foram observadas por até 24 horas e, então, descartadas^{8 31}.

RESULTADOS

Das 135 amostras de poeira e biofilmes, coletadas dos 15 ambientes hospitalares selecionados, 47 (35%) foram positivas para amebas de vida livre (AVL). Foram isoladas amebas de vida livre em todos os ambientes analisados, exceto no centro de tratamento intensivo (CTI). Dois tipos de material foram coletados: poeira e biofilmes. Das 47 (35%) amostras positivas para AVL, 11 (23,4%) foram de poeira provenientes de cinco ambientes: cozinha, emergência, centro cirúrgico ambulatorial, centro cirúrgico, e UTI pediátrica e 36 (76,6%) de biofilmes provenientes de seis bebedouros, dois reservatórios de água e uma torneira da cozinha. Os bebedouros 8 e 14 foram os que apresentaram a maior contaminação por AVL, com 14 amostras positivas dentre as 18 coletadas. A Tabela 1 resume os resultados obtidos nas nove coletas referentes à presença de AVL nos ambientes hospitalares investigados.

Tabela 1 - Número e percentual de amostras positivas para amebas de vida livre em diferentes ambientes hospitalares, no período de julho/04 a março/05.

Ambiente	Amostras positivas n ^o	Percentual (%) de amostras positivas	
		em relação às coletas do ambiente (n=9)	em relação às coletas do hospital (n=135)
Cozinha	6	66,7	4,4
Centro cirúrgico	1	11,1	0,7
UTI pediátrica	1	11,1	0,7
CCA	1	11,1	0,7
Emergência	2	22,2	1,5
CTI	0	0	0
Bebedouro 08	7	77,8	5,2
Bebedouro 13	2	22,2	1,5
Bebedouro 14	7	77,8	5,2
Bebedouro 15	5	55,6	3,7
Bebedouro 19	6	66,7	4,4
Beb emerg*	2	22,2	1,5
Reserv azul**	4	44,4	3
Reserv conc**	1	11,1	0,7
Torneira/cozinha	2	22,2	1,5
Total	47	53	35

*Bebedouro emergência; UTI: unidade de terapia intensiva

**Reservatório azul; CTI: centro de terapia intensiva

***Reservatório concreto; CCA: centro cirúrgico ambulatorial

Das 47 amostras positivas para AVL, 16 (34%) são sugestivas de pertencer ao gênero *Acanthamoeba*. Os isolados apresentaram trofozoítos com locomoção lenta, citoplasma com zona periférica hialina, a partir de onde se notaram projeções hialinas e delgadas, os filopódios ou acantopódios e a presença de vacúolos pulsáteis ou contráteis no citoplasma. Os cistos apresentaram parede com membrana dupla, sendo o endocisto triangular, estrelado ou poligonal e o ectocisto enrugado. Considerando-se o total de amostras coletadas, 11,9% dos isolados apresentaram características do gênero *Acanthamoeba*. Os locais de onde foram isoladas as amebas de vida livre sugestivas de pertencerem ao gênero *Acanthamoeba*, bem como seus percentuais em relação ao total de amostras coletadas (n=135) e ao total de amostras positivas (n=47) estão representados na Tabela 2.

A cozinha foi o segundo ambiente que apresentou o maior índice de contaminação por AVL. Neste local, quando da realização das coletas, também observou-se a presença de umidade e um número grande de pessoas circulando. Também, observaram que *Acanthamoeba* spp foi isolada em 4 coletas realizadas no reservatório de azulejo, localizado no subsolo e que a água deste reservatório é distribuída para todo o hospital. Dos 47 isolados de AVL, provenientes dos ambientes hospitalares, nenhum apresentou exflagelação.

Tabela 2 - Número de amostras positivas para *Acanthamoeba* por ambiente e percentual em relação ao total de amostras coletadas e em relação ao total de amostras positivas.

Ambientes Hospitalares	Número de isolados sugestivos de <i>Acanthamoeba</i>	Percentual de amostras (%)	
		coletadas	positivas
B14	1	0,7	2,1
CC	1	0,7	2,1
CCA	1	0,7	2,1
CZ	6	4,4	12,8
EM	2	1,5	4,2
RA	4	3,0	8,5
UTI	1	0,7	2,1
Total	16	11,8	34

B: bebedouro; CC: centro cirúrgico; CCA: centro cirúrgico ambulatorial; CZ: cozinha; EM: emergência; RA: reservatório azulejo; UTI: unidade de terapia intensiva

DISCUSSÃO

Os relatos sobre o isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas a partir de poeira são escassos. Kingston & Warhurst¹⁶ isolaram essas amebas da poeira e do ar de um quarto ocupado por crianças acometidas de infecção respiratória. Foram utilizadas amostras coletadas através da aspiração do ar ambiente. Os autores isolaram 12 cepas de amebas do gênero *Acanthamoeba* e 3 de *Naegleria*. Giuzzi¹² estudando a prevalência de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em vários habitats na cidade de Araraquara, São Paulo, coletou 23 amostras de poeira, obtendo um percentual de 86,9% para espécies de *Acanthamoeba*, e de 39,1% para espécies de *Naegleria*. Em um estudo, realizado por Rohr e cols²⁶, em 6 hospitais na Alemanha, foram encontradas 29 (52%) amostras positivas para amebas de vida livre em 56 amostras

de água coletadas de sistemas de água quente e 23 (47%) de 49 amostras coletadas com suabes das áreas úmidas de sanitários. Nesse estudo, os autores identificaram grande variedade de espécies de AVL presentes nas áreas úmidas, com 41 organismos identificados pertencentes a 6 diferentes gêneros. *Acanthamoeba* e *Naegleria* foram os gêneros mais isolados, ambos com percentual de 22%. Silva & Rosa³² isolaram AVL potencialmente patogênicas em 60 (45,5%) amostras de poeira de um total de 132, coletadas em dois hospitais da Cidade de Presidente Prudente, SP. Obtiveram de 72 amostras de poeira coletadas no Hospital Universitário, 30 (41,6%) positivas para AVL potencialmente patogênicas. No segundo, Hospital Estadual, foram coletadas 60 amostras de poeira, sendo observadas AVL potencialmente patogênicas em 30 (50%) das amostras. Em outro estudo, Barbeau & Buhler³ analisando amostras de biofilmes de 35 equipos dentários e de 18 torneiras, relataram o isolamento de AVL nos 53 ambientes coletados. Em relação à concentração de AVL isoladas dos biofilmes, os autores chegaram à conclusão de que os equipos dentários tinham uma concentração de AVL três vezes mais alta do que nas amostras de torneira. No presente estudo, foram obtidos 36 isolados de AVL de 6 bebedouros, uma torneira e de 2 reservatórios de água avaliados, sendo, portanto as amostras de biofilmes as que apresentaram maior percentual de positividade quando comparadas às de poeira. Embora, os autores do trabalho anteriormente mencionado não tenham coletado amostras de poeira, a positividade em biofilmes para AVL é quase sempre 100% segundo trabalhos citados na literatura^{5 26 37} e a explicação para esse fato, é que AVL se aderem aos biofilmes para se alimentar das bactérias que os colonizam. Os autores do estudo citado acima, ainda relatam que os equipos dentários tiveram significante positividade, devido esse material ter um diâmetro menor para passagem de líquidos fazendo com que o contato de bactérias com os equipos seja grande, com isso criando biofilmes em toda extensão da tubulação. Esta explicação está em concordância com nossos resultados para as amostras de biofilme, pois nossas coletas nos bebedouros foram realizadas na saída de água de menor diâmetro. No estudo de Silva & Rosa³¹, os autores avaliaram a presença de AVL somente na poeira de diversos ambientes hospitalares e verificaram maior positividade na cozinha e no berçário, provavelmente devido à maior umidade desses locais e também devido ao maior número de pessoas circulando no ambiente.

O menor índice de positividade no referido trabalho ocorreu no centro cirúrgico e UTI, ambientes onde existe um maior cuidado com a limpeza e há um número restrito de profissionais circulando. Os resultados do presente trabalho concordam em relação à positividade de alguns ambientes igualmente selecionados, especialmente em relação à menor positividade, que ocorreu a exemplo do trabalho de Silva & Rosa³¹, em ambientes como o centro cirúrgico, UTI pediátrica e centro de tratamento intensivo. Os resultados, provavelmente se devem ao fato de que nesses locais, por abrigarem pacientes de risco, além da maior preocupação com limpeza e desinfecção, o acesso de pessoas é normalmente restrito a poucos profissionais, que fazem uso de equipamentos de proteção individual, como luvas, máscaras, gorros, protetores de pés e roupas apropriadas e esterilizadas.

Esses cuidados poderiam contribuir para a diminuição da contaminação desses ambientes, já que se sabe que espécies de *Acanthamoeba* têm sido isoladas como flora microbiota normal das vias aéreas superiores de indivíduos saudáveis¹⁸.

Diversos autores concordam que existe certa dificuldade em isolar *Naegleria fowleri* do ambiente²⁴. Pesquisas realizadas nos mais diversos ambientes, em geral mostram percentuais bem menores de isolados de *Naegleria* em relação a outras AVL³⁵. Uma explicação para os baixos índices de recuperação de *Naegleria fowleri* do ambiente seria sua fragilidade. Cursons e cols⁷, estudando a resistência das AVL frente ao efeito de alguns desinfetantes como Deciquam 222, cloro, dióxido de cloro e ozônio, verificaram que todos demonstraram ação desinfetante contra as AVL, porém, eram necessárias concentrações mais altas do que as usadas contra as bactérias. No presente estudo quando foram realizadas as coletas, houve a informação de que era feita limpeza com hipoclorito a 1% no reservatório de concreto a cada seis meses e nos bebedouros era usado hipoclorito a 5%, cada vez que era percebido gosto metálico na água. O uso freqüente desse desinfetante em alguns locais poderia explicar a ausência de isolados de *Naegleria* no ambiente hospitalar. As primeiras amostras positivas para o gênero *Acanthamoeba* no reservatório de água apareceram quando já se fazia necessária nova limpeza e aplicação de hipoclorito a 1%. O estudo realizado por Silva & Rosa³² em poeira de ambientes hospitalares na Cidade de Presidente Prudente, SP, entre os meses de agosto e novembro de 2002, mostrou 45,5% de *Acanthamoeba* spp e 3,8% de *Naegleria* spp. No referido trabalho, foi usada a técnica de exflagelação para identificar o gênero *Naegleria*. A explicação dos autores para seus achados baseou-se no fato de que os cistos de *Naegleria* são poucos resistentes à dessecação e a desinfetantes, fazendo com que apareçam menos em ambientes mais secos ou sujeitos a desinfecções periódicas^{29 33}.

Os resultados encontrados no presente estudo são semelhantes àqueles encontrados pela maioria dos autores que estudaram AVL nos mais variados ambientes, sendo o gênero *Acanthamoeba* o mais isolado mundialmente entre as AVL, principalmente devido à resistência de seus cistos às variações ambientais^{3 6 15 29 36}. É preocupante a ocorrência dessas amebas, já que muitos pacientes internados em hospitais têm sua imunidade deprimida, seja naturalmente devido a doenças ou a pouca idade, ou artificialmente pelo uso de drogas imunossupressoras. Outros são submetidos a cirurgias ou podem, ainda, apresentar problemas de queimadura em áreas extensas da pele, o que pode facilitar a implantação de germes oportunistas, entre os quais, espécies de *Acanthamoeba*.

REFERÊNCIAS

1. Abraham SN, Lawande RV. Incidence of free-living amoebae in the nasal passages of local population in Zaria, Nigeria. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 85:217-222, 1982.
2. Anzil AP, Rao C, Wrzolek MA, Visvesvara GS, Sher JH, Kozlowski PB. Amebic meningoencephalitis in a patient with AIDS caused by a newly recognized opportunistic pathogen: *Leptomyxid* ameba. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 115: 21-25, 1991.
3. Barbeau J, Buhler T. Biofilmes augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. *Research in Microbiology* 152:753-760, 2001.
4. Carter RF. Primary amoebic meningoencephalitis: Clinical pathological and epidemiological features of six fatal cases. *Journal of Pathology and Bacteriology* 96: 1-25, 1968.
5. Casemore DP. Free-living amoebae in home dialysis unit. *Journal Lancet* 2:1078, 1977.
6. Chappell CL, Wright JA, Coletta M, Newsome AL. Standardized method of measuring *Acanthamoeba* antibodies in sera from healthy human subjects. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8:724-730, 2001.
7. Cursons RTM, Brown TJ, Keys EA. Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae: in axenic condition. *Applied and Environmental Microbiology* 40: 62-66, 1980.
8. De Carli GA. Parasitologia Clínica: Seleção e Métodos e Técnicas de Laboratório para Diagnóstico das Parasitoses Humanas. Atheneu, São Paulo, 2001.
9. De Jonckheere JF. Ecology of *Acanthamoeba*. *Reviews of Infectious Diseases* 13: 385-387, 1991.
10. Ferrante A. Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. *Parasite Immunology* 13: 31-47, 1991.
11. Ficker L, Seal D, Warhurst D, Wright P. *Acanthamoeba* keratitis: resistance to medical therapy. *Eye* 4:835-838, 1990.
12. Giazzi JF. Contribuição para o estudo do isolamento, cultivo e manutenção das amebas de vida livre. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 1996.
13. Griffin JL. Temperature tolerance of pathogenic and non pathogenic free-living amoebas. *Science Journal* 178: 869-870, 1972.
14. Illinworth CD, Cook SD. *Acanthamoeba* keratitis. *Survey of Ophthalmology* 42:493-508, 1998.
15. Khan NA. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microbial Pathogenesis* 34:277-285, 2003.
16. Kingston D, Warhurst DC. Isolation of amoebae from the air. *Journal Medical Microbiology* 2:27-36, 1969.
17. Ma P, Willaert E, Juechter KB, Stevens AR. A case of keratitis due to *Acanthamoeba* in New York, New York, and features of 10 cases. *The Journal of Infectious Diseases* 143: 662-667, 1981.
18. Martinez AJ. Free-living amebas: infection of the central nervous system. *The Mount Sinai Journal Medicine* 60:271-278, 1993.
19. Martinez AJ, Janitschke K. *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism: a review. *Infection* 13: 251-256, 1985.
20. Molmeret M, Horn M, Wagner M, Santic M, Kwaik YA. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 20-28, 2005.
21. Morales JL, Rivas AO, Foronda P, Martínez E, Valladares B. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitology Research* 95:273-277, 2005.
22. Murakawa GJ, Mccalmont T, Altman J, Telang GH, Hoffman MD, Kantor GR, Berger TG. Disseminated acanthamebiasis in patients with AIDS. *Archives of Dermatology* 131:1291-1296, 1995.
23. Page FC. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. *Freshwater Biological Association, Ambleside* 1988.
24. Pernin P, Pélandakis M, Roubly Y, Faure A, Siclet F. Comparative Recoveries of *Naegleria fowleri* Amoebae from Seeded River Water by Filtration and Centrifugation. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 955-959, 1998.
25. Rivera F, Ramírez E, Bonilla P, Calderón A, Gallegos E, Rodríguez S, Ortiz R, Zaldívar B, Ramírez P, Durán A. Pathogenic and free-living amoebae isolated from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. *Environmental Research* 62:43-52, 1993.
26. Rohr U, Weber S, Michel R, Selenka F, Wilhelm M. Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1822-1824, 1998.
27. Sawyer TK. Free-living pathogenic and nonpathogenic amoebae in Maryland soils. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1074-1077, 1989.

28. Schuster FL. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amoebas. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 342-354, 2002.
29. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Journal of Parasitology* 34:1001-1027, 2004.
30. Sheehan KB, Fagg JA, Ferris MJ, Henson JM. PCR detection and analysis of the free-living amoeba *Naegleria* in hot springs in Yellowstone and Grand Teton National Parks. *Applied and Environmental Microbiology* 69:5914-5918, 2003.
31. Silva MA. Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de poeira de hospitais da cidade de Presidente Prudente. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2001.
32. Silva MA, Rosa JA. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênica em poeira de hospitais. *Revista de Saúde Pública* 37: 242-246, 2003.
33. Singh BN, Das SR. Intra-nasal infection of mice with flagellate stage of *Naegleria aerobia* and its bearing on the epidemiology of human meningo-encephalitis. *Current Science* 41: 625-628, 1972.
34. Stevens AR, Tyndall RL, Coutant CC, Willaert E. Isolation of the etiological agent of primary amoebic meningoencephalitis from artificially heated waters. *Applied and Environmental Microbiology* 34: 701-705, 1977.
35. Tsvetkova N, Schild M, Panaiotov S, Kurdova-Mintcheva R, Gottstein B, Walonik J, Aspöck H, Lucas MS, Müller N. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitology Research* 92: 405-413, 2004.
36. Visvesvara GS, Stehr-Green JK. Epidemiology of free-living amoeba infections. *Journal of Parasitology* 37:25S-33S, 1990.
37. Walochnik J, Haller-Shober EM, Kölli H, Picher O, Obwaller A, Aspöck H. Discrimination between clinically relevant and nonrelevant *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens-wearing keratitis patients in Austria. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3932-3936, 2000.