

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE *Acanthamoeba* E BACTÉRIAS EM
BIOFILME E LÍQUIDO DE CONSERVAÇÃO DE ESTOJOS DE LENTES
DE CONTATO**

Dissertação de Mestrado

Claiton José Pens

Porto Alegre, 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE *Acanthamoeba* E BACTÉRIAS EM
BIOFILME E LÍQUIDO DE CONSERVAÇÃO DE ESTOJOS DE LENTE DE
CONTATO**

Claiton José Pens

Dissertação apresentada como pré-requisito para a obtenção do grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Abril, 2008

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial às duas melhores influências científicas, que um mestrando poderia ter minha orientadora Prof. Dra. Marilise Brittes Rott e co-orientadora Prof. Dra. Marisa da Costa, que me mostraram como andar pelo caminho da produção científica. Com ética profissional e paciência, trabalharam em mim uma grande falha: a produção textual.

A todo o corpo docente do PPGMAA, pelo compartilhamento de seu conhecimento, suas experiências profissionais, motivo que torna o professor realmente insubstituível no processo de aprendizagem.

A todos os colegas, por participarem ativamente de discussões científicas, ora respondendo ora perguntando. E mais ainda àqueles que direta ou indiretamente cooperaram para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, por fornecer uma base de apoio fundamental à minha formação, apoiando no mais amplo sentido da palavra.

A todos aqueles profissionais técnicos que de alguma forma cooperam para a funcionalidade das instalações físicas dos laboratórios, sem os quais o trabalho seria inviabilizado.

Ao setor de oftalmologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por facilitar as coletas em seus pacientes.

A CAPES por apoiar financeiramente a atividade de pesquisa.

ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE *Acanthamoeba* E BACTÉRIAS EM BIOFILME E LÍQUIDO DE CONSERVAÇÃO DE ESTOJOS DE LENTE DE CONTATO¹.

Autor: Claiton José Pens

Orientadora: Marilise Brittes Rott

Co-orientadora: Profa. Dra. Marisa da Costa

RESUMO

A popularização das lentes de contato possibilitou um aumento na incidência de infecções oculares causadas por diversos microrganismos. Os estojos de lentes de contato compartilham a microbiota do meio ambiente corporal e a ocular, podendo conter biofilmes. O presente trabalho objetivou avaliar a presença de bactérias e *Acanthamoeba* spp. no biofilme e líquido de conservação de lentes de contato. Oitenta e um voluntários requisitados no setor de oftalmologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no Campus Central da UFRGS, responderam um questionário com 17 perguntas e forneceram o estojo de lentes de contato. O material foi coletado entre julho de 2006 e fevereiro de 2007. As amostras foram inoculadas em duplicata em ágar sangue, para isolamento de bactérias e ágar não-nutriente 1,5% com uma sobrecamada de *Escherichia coli*, para isolamento de *Acanthamoeba* spp. Após o isolamento, obteve-se uma contagem bacteriana que variou de zero a 3×10^6 unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Foram identificados 51 gêneros compostos por 10 espécies de bastonetes Gram-negativos, 11 espécies de bastonetes Gram-positivos, 11 de cocos Gram-positivos e 19 espécies de cocobastonetes Gram positivos. Das 81 amostras analisadas, 7 (8,6%) foram positivas para *Acanthamoeba* spp. e o isolamento apresentou correlação com o maior número de UFC/mL. O gênero *Acanthamoeba* foi confirmado pela amplificação do DNA utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gênero. Usuários de lentes de contato mais jovens, apresentaram maior contaminação em seus estojos.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil. (84p.) Abril, 2008.

STUDY OF FREQUENCY OF *Acanthamoeba* AND BACTERIA IN BIOFILM AND LIQUID OF CONTACT LENS CASE¹

Author: Claiton José Pens
Supervisor: Marilise Brittes Rott
Co-Supervisor: Marisa da Costa

ABSTRACT

The popularization of contact lenses allowed an increase in the incidence of eye infections caused by various microorganisms. The cases of contact lenses share the microbiota of the body and eye environment and may contain biofilms. This study aimed to evaluate the presence of bacteria and *Acanthamoeba* spp. in biofilm and preservative liquid of contact lenses. Eighty one volunteer requested in the division of ophthalmology of the Hospital de Clinicas in Porto Alegre and the Central Campus of the Federal University of Rio Grande do Sul, answered a questionnaire with 17 questions and provided the case of contact lenses. The material was collected between July 2006 and February 2007. The samples were inoculated in duplicate on blood agar, for isolation of bacteria and non-nutrient agar 1.5% with the addition of heat-killed *Escherichia coli* for isolation of *Acanthamoeba* spp. After isolation, the bacterial number ranged from zero to 3×10^6 colony forming units (CFU)/mL. Fifty one isolate of bacteria were identified including by 10 species of Gram-negative bacilli, 11 species of Gram-positive bacilli, 11 species of Gram-positive cocci and 19 species of Gram-positive coccobacilli. Of the 81 samples analyzed, 7 (8.6%) were positive for *Acanthamoeba* spp and the isolation showed correlation with the largest number of CFU/mL. The genus *Acanthamoeba* was confirmed by DNA amplification using primers specific to the genus. Younger users of contact lenses presented greater contamination in its contact lens case.

¹ Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (84p.) April, 2008.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Lentes de contato	4
2.2. O estojo das lentes de contatos	5
2.3. Olhos	6
2.4. Microbiota ocular e patologias.....	9
2.4.1. Bactérias	9
2.4.2. Ceratite bacteriana.....	10
2.4.3. <i>Acanthamoeba</i> spp.	11
2.4.3.1. Classificação de <i>Acanthamoeba</i> spp.	12
2.4.3.2. Termotolerância de <i>Acanthamoeba</i> spp.	14
2.4.4. Patologias causadas por <i>Acanthamoeba</i> spp.	15
2.4.4.1. Ceratite por <i>Acanthamoeba</i> spp.	15
a) Patofisiologia da ceratite amebiana	17
2.4.4.2. Encefalite amebiana granulomatosa.....	18
2.5. Biofilme	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Obtenção de amostras	21
3.2. Cepas controle	22
3.3. Processamento das amostras	22
3.3.1. Isolamento e identificação de bactérias.....	22
3.3.2. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos	23
3.3.3. Isolamento e identificação de <i>Acanthamoeba</i> spp.	23
3.4. Exflagelação dos organismos.....	24
3.5. Axenização da cultura de <i>Acanthamoeba</i> spp.	24
3.6. Identificação das AVLs por critérios morfológicos.....	25
3.6.1. Coloração das amebas	25
3.6.2. Confirmação do gênero <i>Acanthamoeba</i> spp. pela técnica da PCR.	26
3.6.2.1. Extração de DNA.....	26
3.6.2.2. Reação em cadeia da polimerase.....	27
3.7. Criopreservação das cepas axenizadas	28
3.8. Teste de tolerância à temperatura.....	28
3.9. Análise estatística.....	29
3.9.1. Cálculo de número amostral	29
3.9.2. Avaliação estatística	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Caracterização dos estojos e usuários de lentes de contato a partir da análise do questionário	30
4.2. Análise microbiológica.....	33
4.2.1. Contagem bacteriana.....	33
4.2.2. Isolamento e Identificação bacteriana	34
4.2.3. Comparação microbiológica entre os grupos de acadêmicos da UFRGS e pacientes do HCPA.	39
4.3. Antibiograma com as bactérias isoladas dos estojos de lentes de contato.....	40
4.4. Caracterização do usuário AVL positivo	44
4.5. Avaliação microbiológica dos estojos AVL positivos.....	45
4.5.1. Comparação entre os grupos de acadêmicos da UFRGS e pacientes do HCPA.....	45
4.6. Identificação do gênero <i>Acanthamoeba</i> spp.	46
4.6.1. Teste de exflagelação das AVL	49
4.6.2. Confirmação do gênero <i>Acanthamoeba</i> spp.	50
4.7. Teste de tolerância à temperatura.	51
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

A. RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização do usuário de lentes de contato.....	30
Tabela 2. Bastonetes Gram-negativos isolados de estojos de lentes de contato.....	35
Tabela 3. Bastonetes Gram-positivos isolados de estojos de lentes de contato.....	36
Tabela 4. Cocos Gram-positivos isolados de estojos de lentes de contato.....	37
Tabela 5. Cocobastonetes Gram positivos isolados de estojos de lentes de contato.....	38
Tabela 6. Identificação dos cistos de <i>Acanthamoeba</i> spp.	47
Tabela 7. Teste de tolerância de <i>Acanthamoeba</i> spp. a diferentes temperaturas.....	52

B. RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1. Estojo de lentes de contato.....	6
Figura 2. Desenho esquemático da morfologia ocular.....	7
Figura 3. Classificação taxonômica de AVL.....	11
Figura 4. Morfologia celular de <i>Acanthamoeba</i> spp.	12
Figura 5. Morfologia cística de <i>Acanthamoeba</i> spp.	13
Figura 6. Aspecto da ceratite amebiana.....	15
Figura 7. Patofisiologia da ceratite.....	17
Figura 8. Comparação da microbiota existente em 81 estojos de lentes de contato de voluntários, segundo o tipo de voluntário.....	39
Figura 9. Isolado de AVL 18M.....	48
Figura 10. Isolado de AVL 20P.....	48
Figura 11. Isolado de AVL 30G.....	48
Figura 12. Isolado de AVL 32S.....	48
Figura 13. Isolado de AVL 45M.....	48
Figura 14. Isolado de AVL 48 L.....	48
Figura 15. Isolado de AVL 78L.....	49
Figura 16. Análise molecular.....	50

C. RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	percentual
-	negativo
+	positivo
®	marca registrada
°C	Graus Celsius
µL	microlitro
µL/mL	microlitro por mililitro
µmol	micromol
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
ATCC	American Type Culture Collection
<i>apud</i>	citado por
AVL	amebas de vida livre
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm ²	centímetro quadrado
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
<i>et al.</i>	e colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
h	hora
kDa	quilodalton
PCR	reação em cadeia da polimerase
RNA	ácido ribonucléico
RPM	rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
sp.	espécie
spp.	espécies
ssu	subunidade menor
TE	Tris-EDTA
™	trade mark
TSA	água triptose de soja
U	Unidade
UFC	Unidade formadora de colônia
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
V/V	volume por volume

1. INTRODUÇÃO

Durante a década de 80 os avanços nas pesquisas oftalmológicas e a tecnologia de materiais permitiram a popularização das lentes de contato, proporcionando correções de visão, que antes não eram possíveis com a utilização de óculos, como a ceratocone, por exemplo. Assim, o uso das lentes de contato, principalmente as lentes flexíveis e de uso prolongado tornou-se mais freqüente, havendo um aumento proporcional do número de casos de inflamações oculares.

O manuseio incorreto das lentes de contato e dos produtos envolvidos em sua manutenção serve como fonte de microrganismos oportunistas como *Acanthamoeba* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*.

Os olhos possuem um micro-habitat, formado pelo saco conjuntival com uma microbiota peculiar, apresentando um grande número de microrganismos oportunistas. Infecções oculares geralmente resultam de desequilíbrios como a baixa de imunidade, lesão na integridade dos tecidos, uso de antimicrobianos ou a introdução de algum patógeno capaz de superar todas as defesas naturais e estabelecer-se.

Os olhos possuem uma microbiota equilibrada e bastante específica constituída principalmente por bactérias como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Neisseria meningitidis*. Essas três últimas espécies são freqüentemente encontradas em infecções oculares, embora fazendo parte da microbiota. Os biofilmes, presentes nas lentes de contato, provocam desconforto e podem causar inflamações por trauma ou proporcionar a instalação de um processo infeccioso. A infecção corneal é a mais séria complicação que pode ocorrer em usuários de lentes de contato, tanto das lentes corretivas da visão como das cosméticas.

Entre as infecções oculares, a ceratite por *Acanthamoeba* spp. tem mostrado um aumento significativo principalmente entre usuários de lentes de contato. A infecção caracteriza-se por dor, fotofobia, diminuição da visão, lacrimejamento e edemas. Em avaliações biomicroscópicas observa-se infiltrados estromais, defeitos no epitélio da córnea e raramente esclerite.

A *Acanthamoeba* spp. é uma ameba de vida livre (AVL) amplamente distribuída no ambiente. No olho seu crescimento encontra-se facilitado pela presença da microbiota natural, fonte de alimento para este protozoário.

Inicialmente, a ocorrência da ceratite acantamebiana estava relacionada com traumatismos oculares. Atualmente, estudos demonstram que mais de 90% dos casos ocorrem em usuários de lentes de contato, sendo o uso inadequado das lentes o principal fator predisponente.

O estojo de lentes de contato é o local onde as lentes são acondicionadas quando não estão em uso e são freqüentemente contaminados por microrganismos colonizadores primários, presentes na solução de limpeza,

nas lentes de contato, mãos e ar, formando o biofilme e sujeitando as lentes de contato a um processo contínuo de contaminação.

As infecções oculares alteram a integridade do olho e produzem uma significativa destruição tecidual, que pode culminar na perda da visão e até na enucleação. Esses problemas necessitam de um diagnóstico e uma terapia apropriados para melhorar o prognóstico, principalmente no caso das ceratites e endoftalmites. Conhecer os microrganismos causadores do processo e progressão da doença, bem como o estabelecimento de um tratamento coerente e eficaz influenciam a evolução e o prognóstico. A ceratite por *Acanthamoeba* spp., em especial, é de difícil tratamento devido às características biológicas do protozoário, sendo o diagnóstico precoce essencial para evitar tratamentos mais agressivos.

A proposta deste trabalho é conhecer os microrganismos presentes em estojos de lentes de contato de usuários assintomáticos, bem como avaliar os riscos de contaminação aos quais os usuários estão expostos, dada a relevância das infecções oculares.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Lentes de contato

As lentes, em geral, possuem a mesma função corretiva dos óculos convencionais, porém elas são mais leves e invisíveis sobre a córnea, podendo ser lentes corretivas, cosméticas ou terapêuticas. Algumas condições oftalmológicas como a ceratocone podem não ser precisamente corrigida com o uso de óculos, fazendo-se necessária a utilização de lentes de contato (Dixie, 1998)

Estima-se que cerca de 125 milhões de pessoas no mundo usem lentes de contato (2% da população mundial). Os tipos de lentes utilizadas e prescritas variam consideravelmente entre os países. As lentes de contato rígidas representam cerca de 20% das lentes prescritas no Japão, Holanda e Alemanha, porém representam menos de 5% das prescritas na Escandinávia, por exemplo (Dixie, 1998; Efron, 2002).

As primeiras lentes de contato foram produzidas na Alemanha em 1887 e, desde o início, procuraram-se materiais mais eficientes na sua

produção. Na década de 30 foi desenvolvido o polimetilmetacrilamida que foi aperfeiçoado até a década de 80, melhorando a qualidade das lentes e diminuindo os custos de produção, permitindo assim a sua popularização. Na década de 90 foi desenvolvido o hidrogel (lente gelatinosa), que facilita as trocas gasosas entre a conjuntiva e o meio ambiente (Dart, 1990; Larkin *et al.*, 1990).

Com a popularização do uso das lentes de contato, principalmente as flexíveis e de uso prolongado, houve um aumento proporcional do número de casos de inflamações oculares. Isto porque o manuseio do estojo e dos produtos envolvidos com sua manutenção serve como veículo para microrganismos oportunistas, como *Acanthamoeba* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (Limberg, 1991). Usuários de lentes de contato estão 80 vezes mais sujeitos às infecções causadas por *Acanthamoeba* spp. do que pessoas que não as utilizam (Poggio *et al.*, 1989).

Atualmente existe uma variedade de lentes de contato disponíveis no mercado, ficando a critério do especialista a sua prescrição. Os tipos são classificados conforme o material que elas são construídas: rígidas, gelatinosas de uso diário e de uso contínuo. As gelatinosas de uso contínuo podem ser utilizadas inclusive para dormir, caso o usuário esteja bem adaptado (Swarbrick *et al.*, 2001).

2.2. O estojo das lentes de contatos

O estojo (figura 1), onde habitualmente são acondicionados as lentes de contato retém resíduos com o tempo e poderão constituir a origem da

contaminação das lentes. Este estojo encontra-se permanentemente banhado pela solução de conservação, na qual as lentes ficam imersas. Caso a manipulação, seja inadequada ocorre um processo de contaminação contínua formando biofilmes, tanto no estojo como nas lentes de contato. A origem a contaminação pode ser a solução de limpeza, as lentes ou as próprias mãos, contaminados com microrganismos (Davey & O'Toole, 2000; Kyaw, 2006).



FIGURA 1. Estojo de lente de contato.

2.3. Olhos

Os olhos são órgãos receptores altamente complexos, que fazem parte do sistema sensorial. São encarregados de captar estímulos luminosos para que o sistema nervoso possa exercer sua função integradora e coordenativa (Dangelo & Fattini, 2004). Possuem um sistema complexo de proteção, formado pelos supercílios, cílios, pálpebras e glândulas lacrimais. Internamente as pálpebras possuem uma membrana muito fina que também reveste a córnea e está disposta em forma de saco. A conjuntiva (figura 2), por sua vez está intimamente relacionada com o sistema linfático, constituindo-se também em uma barreira mecânica e biológica contra microrganismos (Knop & Knop, 2000). A lágrima, que banha a conjuntiva, contém enzimas como

lisozima, lactoferrina e betalísina, que atuam como anti-sépticos naturais (Limberg, 1991).

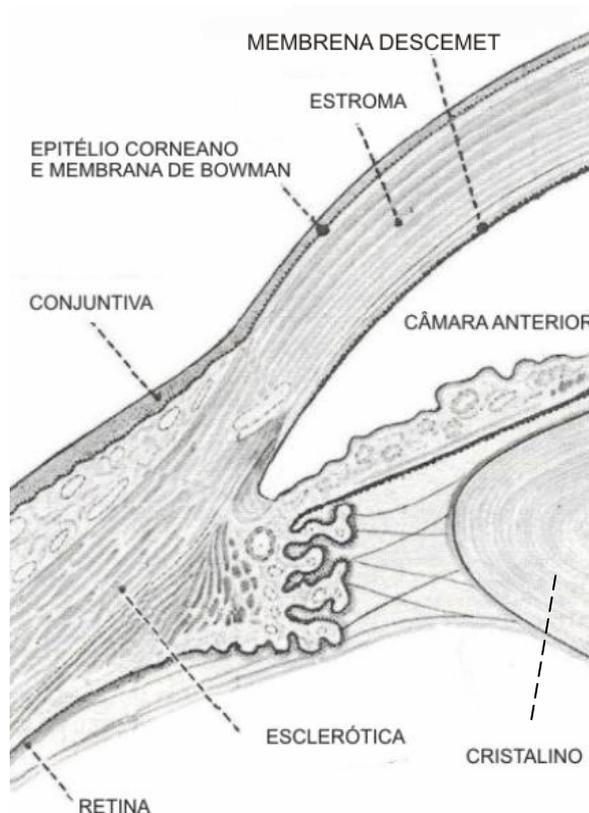


FIGURA 2. Desenho esquemático de corte transversal demonstrando as principais estruturas do olho.

Fonte: Adaptado de Hamilton (1982).

A córnea é a parte anterior transparente e protetora do olho que fica localizada na região polar anterior do globo ocular. A córnea e o cristalino têm a função de focar a luz através da pupila para a retina, como se fosse uma lente fixa. São as lágrimas que mantêm a córnea úmida e saudável. Sua estrutura é avascularizada e sua inervação é desprovida de bainha de mielina, o que garante sua total transparência (Smolin, 1987; Dangelo & Fattini, 2004).

A conjuntiva é a camada superficial da córnea e compõe-se de quatro a seis camadas de células do tipo epitélio escamoso estratificado, não sendo queratinizado. Enquanto as células mais superficiais (mais antigas) começam a descamar, outras células novas vão tomando a forma estratificada. O epitélio apresenta-se com uma superfície lisa e brilhante, assegurando a capacidade refrativa. Funciona como um bloqueio contra perda de líquidos e evita a penetração de microrganismos (Hamilton, 1982; Dangelo & Fattini, 2004).

A camada seguinte ao epitélio é a membrana de Bowman, a qual é formada de células do epitélio basal, da lâmina basal e de fibras do estroma anterior. A sua espessura varia de 8 a 12 μm e é formada por fibras de colágeno e proteoglicanos, tendo o poder de se regenerar uma vez lesionada. Sua função baseia-se em manter a integridade e a organização epitelial e manter o epitélio separado do estroma. Profundamente ao estroma e revestindo a superfície estromal se encontra a membrana Descemet. Esta membrana está sob grande pressão intra-ocular e quando seccionada se retrai não se regenerando após lesão. Quando ocorre perda de células endoteliais, aquelas células que sobraram deslocam-se na direção da área lesionada para preencher esse espaço, aumentando seu tamanho (polimegatismo) e sua forma (pleomorfismo). Todo esse mecanismo é responsável pelo reparo do endotélio, sendo a mitose nas células endoteliais adultas lenta e escassa. É imprescindível enfatizar que o endotélio é de suma importância para manter a transparência e organização das camadas da córnea (Hamilton, 1982; Knop & Knop, 2000).

Alguns microrganismos, como a *Acanthamoeba* spp. podem invadir os tecidos e se estabelecer no estroma, que é o interior da córnea causando graves infecções que podem culminar com a enucleação do globo ocular (Khan 2002).

2.4. Microbiota ocular e patologias

Os olhos possuem uma microbiota equilibrada e bastante específica. A composição da comunidade microbiana tem início ao nascer, quando os olhos são rapidamente colonizados por vários microrganismos, que se mantêm até a fase adulta com algumas modificações na composição (Kaufman *et al.*, 2000).

2.4.1. Bactérias

A microbiota bacteriana do indivíduo adulto é constituída principalmente por bactérias como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Neisseria meningitidis*. O processo infeccioso ocorre quando algum fator modifica as condições normais do olho, podendo ser químico como a adição de medicamentos ou físico como atritos causados pela colocação de lentes de contato. O dano causado pelos microrganismos está relacionado com a capacidade deles produzirem fatores agressivos às células (Limberg, 1991).

Cerca de 90% dos casos de ceratites bacterianas são causadas por organismos incluídos nos grupos, *Micrococcaceae*, *Pseudomonaceae* e *Enterobacteriaceae*. Os organismos mais comumente encontrados causando

infecção são *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Proteus* sp. (Vieira *et al.*,1999; Kaufman *et al.*, 2000).

2.4.2. Ceratite bacteriana

O uso de lentes de contato representa ser o principal fator de risco para o desenvolvimento de ceratite bacteriana. Calcula-se um aumento de 10 a 15 vezes no risco de ceratite infecciosa pelo hábito de dormir com as lentes de contato quando comparado com o uso diurno (Stein *et al.*,1995). A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é o microrganismo isolado com maior frequência em ceratites bacterianas em usuários de lentes de contato hidrofílicas (gelatinosas) (Stein *et al.*,1995; Liesegang, 1997).

Nos Estados Unidos, a incidência anual média estimada de ceratite é de 21 por 10.000 usuários para uso diário de lente de contato gelatinosa (Poggio *et al.*,1989). Esta média é semelhante na Suíça, Escócia e países baixos (Nilsson & Montan, 1994; Cheng *et al.*, 1999; Seal *et al.*, 1999),

Os biofilmes, além de provocarem desconforto e turvação visual podem ocasionar irritação local, facilitar a aderência de microrganismos e levar à infecção (Liesegang, 1997). *Pseudomonas aeruginosa* é especialmente capaz de aderir-se à superfície da lente, principalmente na presença de biofilmes. A hipoxia durante o fechamento palpebral (durante o sono) resulta em comprometimento da barreira epitelial, permitindo a adesão e subsequente invasão por microrganismos (Aswad *et al.*,1989).

2.4.3. *Acanthamoeba* spp.

A *Acanthamoeba* spp. é um protozoário pertencente ao filo Sarcomastigophora e subfilo Sarcodina (figura 3). São amebas de vida livre (AVL) ubiqüitárias, presentes no solo, fontes naturais de água, rios, lagos, água de torneira, reservatórios, soluções de lentes de contato, piscinas, água salinizada e ar (Hargrave *et al.*, 1999; Marciano-Cabral & Cabral, 2003).

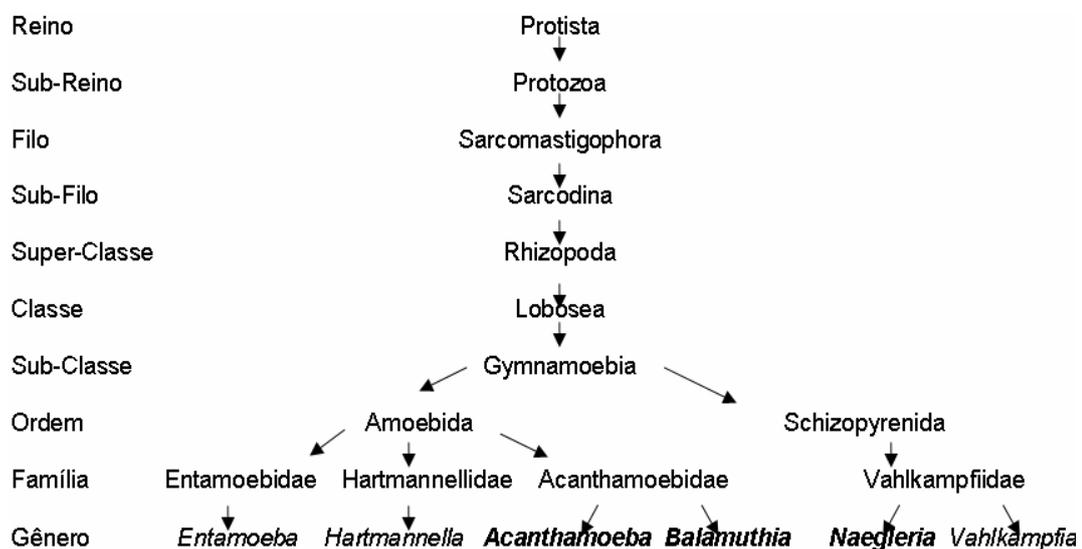


FIGURA 3. Classificação taxonômica de amebas de vida livre.
Fonte: Adaptado de Corliss (1988).

Este protozoário possui duas formas biológicas: o trofozoíto que é a forma vegetativa da célula e o cisto que é a forma de resistência (figura 4). Os trofozoítos variam de 25 a 45 μm de diâmetro e apresentam uma característica marcante do gênero que são os acantopódios, projeções da membrana celular, os cistos possuem dupla camada e medem em média 19 μm de diâmetro (Neff *et al.*, 1969).

A significância ecológica de *Acanthamoeba* spp. está na participação no ciclo dos nutrientes, fagocitando bactérias, fungos, outros protozoários, matéria orgânica em decomposição e pinocitando partículas líquidas. Este protozoário tem sido descrito como um patógeno oportunista, não necessitando de um hospedeiro para seu ciclo de vida (Hargrave *et al.*,1999; Niederkorn *et al.*,1999).

]

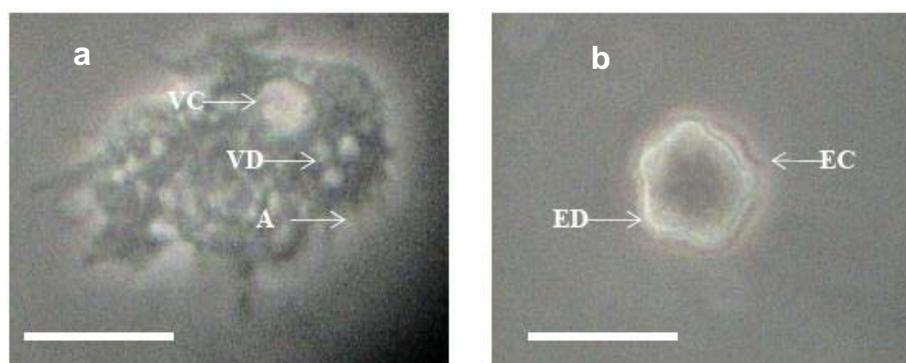


FIGURA 4. Morfologia celular de *Acanthamoeba* spp. (a) trofozoítica; (b) cística; VC-vacúolo contrátil, VD-vacúolo digestivo, A-acantopódio, EC-ectocisto e ED-endocisto (400X). Barra em (a) 15 μ m em (b) 20 μ m. Fonte: Laboratório de Parasitologia – Departamento de Microbiologia/UFRGS.

Em condições adversas como desidratação, falta de nutrientes ou a presença de substâncias tóxicas, os trofozoítos formam cistos resistentes às agressões ambientais e podem permanecer viáveis no meio ambiente até encontrar condições favoráveis para retornar à forma de trofozoíto. O maior tempo de viabilidade já observado foi de 20 anos (Illingworth & Cook.,1998).

2.4.3.1. Classificação de *Acanthamoeba* spp.

A classificação taxonômica é controversa devido ao desequilíbrio causado pela supressão de recombinação causada pela reprodução

assexuada. Este tipo de reprodução faz com que ocorra diferenciação genotípica e fenotípica em uma mesma espécie, originando polimorfismo (Futuyma, 1992). Muitos autores têm proposto diferentes metodologias para sua identificação.

Pussard e Pons (1977) propuseram a classificação baseada na morfologia dos cistos (figura 5), classificando *Acanthamoeba* spp. em três grupos. Page (1988), utilizando os critérios morfológicos sugeridos por Pussard e Pons, juntamente com o comportamento do trofozoíto em diferentes temperaturas e tipo de locomoção criou uma chave dicotômica para identificação das AVL, sendo que nesta classificação estão alocadas 22 espécies.

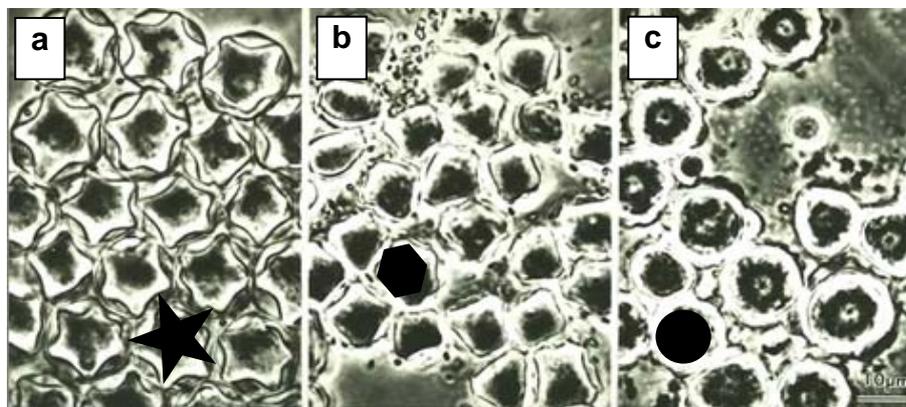


FIGURA 5. Morfologia cística de *Acanthamoeba* spp. a - Grupo I com aparência estrelado, b- Grupo II com aparência poligonal e c- Grupo III com aparência circular. Fonte: Adaptado de Page (1988).

Grupo I – Cistos relativamente grandes, com endocisto estrelado e ectocisto liso e esférico.

Grupo II – Endocisto levemente estrelado e poligonal com o ectocisto irregular ou rugoso.

Grupo III – Endocisto arredondado ou fracamente angular e o ectocisto fino e liso ou fracamente franzido

Nos últimos anos a classificação morfológica deu lugar ao uso de técnicas moleculares, muitas vezes com o abandono de hipóteses sobre as relações filogenéticas e o reconhecimento de novas espécies. Esta metodologia, baseia-se principalmente na comparação da seqüência conservada dos genes das subunidades 16S e 18S do rDNA. Por este método o gênero *Acanthamoeba* está dividido em 16 diferentes genótipos, que estão relacionados com a virulência da ameba, sendo classificados em T1, T2a e T2b, T3 à T15 (Gast, 2001; Schuster & Visvesvara, 2004).

2.4.3.2. Termotolerância de *Acanthamoeba* spp.

A termotolerância é um dos fatores de virulência presentes em algumas cepas de *Acanthamoeba* spp. (Walochnik *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2001, 2002; De Jonckheere, 2003). Apesar do mecanismo de adaptação termotolerante não estar bem definido, alguns estudos com cepas de *Acanthamoeba* spp., isoladas de infecções, demonstraram que há uma correlação entre a patogenicidade e termotolerância. A termotolerância é uma característica genotípica de algumas AVL que pode se expressar em um hospedeiro, conferindo a elas a capacidade de permanecerem viáveis nos mesmos (Odom *et al.*, 1997; Shuster & Visvesvara 2004a).

2.4.4. Patologias causadas por *Acanthamoeba* spp.

Acanthamoeba spp. é um patógeno oportunista causador de ceratite e encefalite, entre outras infecções (Schuster & Visvesvara, 2004).

2.4.4.1. Ceratite por *Acanthamoeba* spp.

A ceratite causada por *Acanthamoeba* spp. é uma infecção da córnea caracterizada por dor intensa, fotofobia, diminuição da visão, lacrimejamentos e edemas. Em achados biomicroscópicos de limbite observam-se infiltrados estromais, defeitos no epitélio da córnea e raramente esclerite (figura 6) (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Schuster & Visvesvara, 2004b).

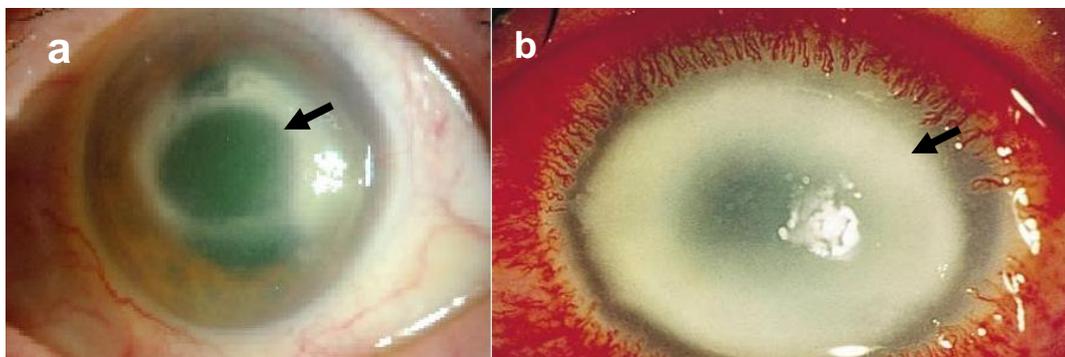


FIGURA 6. Aspecto da ceratite amebiana. a) Anel infiltrado em estágio inicial; (b) Anel de infiltrado em ceratite em estado avançado (5 meses depois do início dos sintomas). Fonte: Cooke, (2008)

O primeiro diagnóstico de ceratite por *Acanthamoeba* spp. em humanos ocorreu em 1973 por Nagington e colaboradores (1974) na Inglaterra e foi publicado no ano seguinte nos Estados Unidos (Nagington *et al.*, 1974 *apud* Illingworth *et al.*, 1998). No Brasil, Nosé e colaboradores (1988) descreveram os primeiros casos.

Inicialmente a ocorrência da doença estava relacionada com traumatismos oculares, principalmente em áreas rurais. Porém, estudos atuais demonstram que mais de 90% dos casos ocorrem em usuários de lentes de contato. Os fatores que predispõem à ceratite nos usuários de lentes de contato são o uso de soluções não estéreis, banho de piscina usando lentes de contato e desinfecção inadequada das lentes após o uso (Radford *et al.*, 2002).

Apesar da ampla variabilidade de genótipos, apenas os isolados dos genótipos T2, T3, T4, T6 e T11 têm sido associados com ceratite (Walochnik *et al.*, 2000; De Jonckere, 2003). O genótipo T4 apresenta a dominância de 90% nos casos de ceratite causadas por *Acanthamoeba* spp. Sete espécies têm sido mais freqüentemente associadas a infecções oculares: *Acanthamoeba castellanii* (T4), *A. lugdunensis* (T4), *A. polyphaga* (T4), *A. rhyodes* (T4), *A. culbertsoni* (T3), *A. hatchetti* (T11) *A. griffini* (T3) (Yu *et al.*, 2004).

A presença de endossimbiontes tem sido demonstrada em muitas espécies de protozoários. Os simbiontes podem ocorrer naturalmente ou podem representar organismos fagocitados que se adaptaram ao ambiente intracelular. Bactérias fagocitadas podem crescer e se reproduzir dentro de protozoários. Vários estudos têm especulado que a endossimbiose bacteriana possa ser um fator de virulência potencial, pois a bactéria pode sair do protozoário e provocar processos infecciosos (Szénási *et al.*, 1998).

A endossimbiose ocorre comumente entre membros da família *Acanthamoebidae*. O papel de tais bactérias na patogênese permanece desconhecido, mas elas têm sido implicadas no desenvolvimento de ceratite amebiana (Fritsche *et al.*, 1993).

a) Patofisiologia da ceratite amebiana

As *Acanthamoeba* spp. aderem-se às glicoproteínas manosiladas, expostas em alguma lesão do epitélio córneo, através de uma adesina. O contato com a manose induz o trofozoíto a produzir uma protease extremamente citotóxica e citolítica para o epitélio córneo, iniciando a invasão córnea (Muñoz *et al.*, 1982; Huston, 2004).

Os trofozoítos penetram pela membrana de Bowman e invadem o estroma. Em seguida a ameba produz várias proteases como: serino-protease, cisteíno-protease, elastase e metaloproteases (figura 7) (Hadas & Mazur, 1993; Marciano-Cabral & Cabral, 2003).

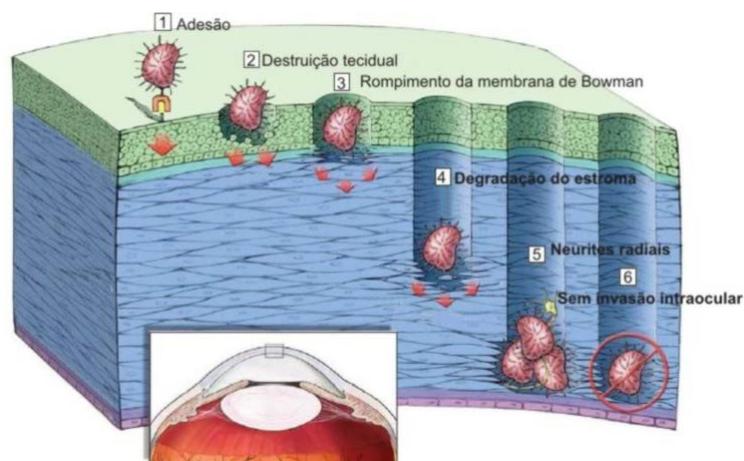


FIGURA 7. Patofisiologia da ceratite amebiana. 1) Adesão; (2) produção de proteinase induzida por manose; (3) Rompimento da membrana de Bowman e invasão do estroma; (4) Produção de proteases; (5) Ataque aos nervos córneos; (6) Raramente evolui para endoftalmite. Fonte: Adaptado de Clarke & Niederkorn (2006).

A atividade das enzimas vai produzir a lesão característica da infecção: o infiltrado em forma de anel (He *et al.*, 1990). A dor associada com a ceratite amebiana é causada pela ação das enzimas sobre o tecido nervoso da córnea e dos tecidos adjacentes, que podem ser lisados ou induzidos à apoptose (Pettit *et al.*, 1996).

2.4.4.2. Encefalite amebiana granulomatosa

O nome da doença se refere à formação de granuloma, devido à presença do protozoário. Os mecanismos associados com a patologia não estão muito claros, mas as complicações patofisiológicas envolvem o sistema nervoso central, onde há a indução de uma resposta pró-inflamatória, a partir da invasão pela barreira hemato-encefálica e a ligação ao tecido, seguida de lesão neuronal (Khan, 2003; Schuster & Visvesvara, 2004).

É uma infecção considerada oportunista, que acomete o sistema nervoso central de indivíduos imunodeprimidos. A invasão pode ocorrer pela pele (ulcerações) ou pelo trato respiratório (neuroepitélio), seguindo então por via sangüínea até o sistema nervoso central (Martinez & Visvesvara, 1997)

A infecção é considerada crônica, podendo levar de semanas a anos para que os sintomas clínicos apareçam. Geralmente, o diagnóstico só é obtido após a necropsia através da análise microscópica das formas trofozoíticas no tecido cerebral, porém, a constatação de altos níveis de anticorpos *Acanthamoeba*-específicos pode ajudar na confirmação da suspeita da infecção. Além dessas análises, métodos baseados na reação em cadeia

da polimerase (PCR) estão sendo desenvolvidos para agilizar o diagnóstico e aumentar a chance de cura (Khan, 2003; Schuster & Visvesvara, 2004).

2.5. Biofilme

O conhecimento sobre as bactérias é baseado no estudo de cultura pura, mas em seus habitats naturais várias espécies de microrganismos vivem associadas formando comunidades ecológicas, aderidas às superfícies, compondo um ecossistema estruturado e dinâmico, denominado biofilme (Ronner & Wong, 1993; Rickard, *et al.*, 2002).

A formação de um biofilme ocorre em etapas distintas, sendo influenciada por fatores que levarão à adesão, como a disponibilidade e concentração de nutrientes, pH, temperatura, concentração de eletrólitos, fluxo de material e o tipo de superfície (Marshall, 1986). Uma ou mais bactérias, da mesma espécie ou de espécies distintas, se aderem em uma superfície com um habitat suscetível, sintetizando uma matriz exopolissacarídica, que atua como substrato para a aderência. As condições do microambiente são modificadas pela colônia, para que outras bactérias venham a se aderir, resultando a sucessão colonial na formação de uma comunidade complexa (Jenkinson & Lappin-Scott, 2001; Richard *et al.*, 2003).

No estojo de lentes de contato os microrganismos presentes são oriundos das mãos do usuário, das lentes de contato, da microbiota ocular ou outro local onde a lente tenha tocado ou da solução de manutenção utilizada para a limpeza da lente e estojo. Após o estabelecimento do biofilme, as lentes de contato são permanentemente colonizadas fornecendo para a

Acanthamoeba spp. um nicho atrativo com nutrientes abundantes e resistência a desinfetantes (Beattie *et al.*, 2003). Estas condições propiciam a permanência da ameba na forma trofozoítica, que é a forma infectiva (Dudley *et al.*, 2005; Garate *et al.*, 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção de amostras

O presente estudo avaliou a microbiota bacteriana e a presença ou ausência de amebas de vida livre, em estojos de lentes de contato. Os estojos foram cedidos sob termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO I) por 81 voluntários: 37 alunos do Campus Central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e 44 pacientes do ambulatório de oftalmologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Para a realização da pesquisa o projeto foi submetido à Comissão de Ética do HCPA (processo número 06290/2006).

A todos os voluntários foi aplicado um questionário (ANEXO II) com questões envolvendo: dados pessoais, tipo de lente de contato, procedimento de higienização, tempo e forma de utilização, histórico clínico e terapêutico, tratamentos e medicamentos utilizados durante alguma infecção. A partir destas informações foi possível verificar se em algum momento o paciente apresentou qualquer patologia associada ao uso da lente.

3.2. Cepas controle

Foram utilizadas as cepas: *Acanthamoeba castelanii* (ATCC 50492), como controle positivo para a PCR, *E. coli* (ATCC 25922), para cultivo monoxênico de *Acanthamoeba* spp., *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) como cepas controle dos antibiogramas.

3.3. Processamento das amostras

Os estojos foram abertos em condições assépticas e o biofilme existente em seu interior foi removido utilizando um suabe. A suspensão formada pelo líquido de conservação e o biofilme removido era transferida para um tubo de ensaio contendo 800 µL de solução salina 0,85%. O suabe, juntamente com o líquido, foi agitado 10s à 180 rpm (vórtex Phoenix AP 56) obtendo-se uma suspensão.

3.3.1. Isolamento e identificação de bactérias

As suspensões obtidas foram submetidas a sucessivas diluições decimais, em salina, conforme método desenvolvido em testes pilotos, até convencionarem-se as melhores diluições a serem utilizadas.

Uma alíquota de 100µL, da diluição 10^{-1} foi semeada, em duplicata, por espalhamento em agar acrescido de 5% de sangue ovino, sendo as placas incubadas a 37°C por até 48 horas, em aerobiose.

Após a incubação, era realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) nas placas com crescimento bacteriano, seguida do isolamento de cada tipo de colônia em ágar triptose de soja (TSA).

A identificação bacteriana foi realizada conforme critérios morfológicos e bioquímicos descritos por e MacFaddin (2000). Todas as cepas isoladas foram congeladas em caldo infusão de cérebro e coração, 15% glicerol e conservadas a -20°C .

3.3.2. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade das bactérias isoladas foi determinado frente a vários agentes antimicrobianos através de testes de difusão em ágar, conforme recomendações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2006).

Foram testados os seguintes antimicrobianos: ácido nalidíxico, amoxicilina, cefalotina, cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina, gentamicina, rifampicina, tetraciclina e vancomicina.

3.3.3. Isolamento e identificação de *Acanthamoeba* spp.

Para o isolamento de *Acanthamoeba* spp., o restante da suspensão retirada dos estojos foi centrifugada a 250xg durante 10min. Uma alíquota de 100 μL do sedimento foi inoculada no centro de uma placa de Petri com ágar não-nutriente (1,5%) contendo uma sobre-camada de *Escherichia coli* (o cultivo de *E. coli* foi feito em meio TSA por 24h, sendo inativadas a $56^{\circ}\text{C}/2\text{h}$ antes da utilização). Após a inoculação do sedimento a placa foi fechada, selada com

um filme plástico (Parafilm®) e incubada a 30°C por até 15 dias (De Carli, 2001).

Durante o período de incubação as placas foram examinadas ao microscópio óptico (100X) e avaliadas quanto à presença de trofozoítos ou cistos.

A identificação das amebas foi realizada de acordo com os critérios morfológicos estabelecidos por Page (1988).

3.4. Exflagelação das amebas

Para a exclusão da espécie *Naegleria fowleri*, foi realizada em triplicata a técnica de exflagelação dos microrganismos. Após o crescimento de trofozoítos nas placas de ágar não-nutriente (1,5%) a superfície do ágar foi gentilmente raspada e os protozoários transferidos para garrafas de cultivo de células (25 cm³) contendo 10 mL de água destilada e incubadas a 37° C por uma hora. As garrafas foram examinadas em microscópio invertido a cada 30 min durante 4 horas, para verificar a emissão de flagelos característicos de *N. fowleri*. As amostras negativas foram ainda observadas após 24 h (De Carli, 2001; Silva & Rosa, 2001).

3.5. Axenização da cultura de *Acanthamoeba* spp.

Após a visualização das AVL nas placas, através da observação microscópica, subcultivos das amebas eram feitos, retirando-se um pedaço do ágar, onde eram melhor visualizadas as AVLs e onde havia menos contaminantes como fungos filamentosos. O pedaço de ágar era transferido

para outra placa nas mesmas condições da cultura primária. Este procedimento era realizado até que apenas estivessem na placa *Acanthamoeba* spp. e o mínimo possível de contaminantes.

Posteriormente o material foi raspado cuidadosamente, com alça de platina e transferido para um tubo de ensaio com 5 mL de meio proteose peptona 2%, extrato de levedo 0,2% e glicose 1,8 % (PYG) (ANEXO 3), suplementado com penicilina G potássica (400 UI/mL) e estreptomicina (400 µL/mL) e incubado a 30°C. A cada 2 dias alíquotas eram retiradas e observadas ao microscópio óptico. Subcultivos foram realizados no mesmo meio até a obtenção de uma cultura pura (De Carli, 2001).

3.6. Identificação das AVLs por critérios morfológicos

3.6.1. Coloração das amebas

Para a identificação, as amebas eram coradas conforme metodologia descrita por Brückner (1993). Para a coloração eram utilizadas culturas axênicas. Uma alíquota de 3 mL do meio com crescimento de amebas era centrifugada a 5000xg por 3 minutos. O sedimento resultante era ressuspenso em tampão fosfato pH 7,2 (PBS), sendo uma alíquota transferida para uma lâmina.

Após secagem à temperatura ambiente, as lâminas eram fixadas em fixador de Schaudinn (ANEXO 3) durante uma hora, à temperatura ambiente. Após a fixação eram coradas em cubas de *Coplin* pela coloração de tricrômico (ANEXO 3) e observada em microscópio óptico (1000X).

Os organismos foram avaliados quanto as suas características morfológicas e classificados segundo critérios descritos por Page (1988), que incluem os seguintes parâmetros: diâmetro do cisto, número de braços, forma do endocisto, espessura e textura do ectocisto. Para a avaliação das dimensões foram medidos 10 organismos à microscopia óptica e feita a média aritmética.

3.6.2. Confirmação do gênero *Acanthamoeba* spp. pela técnica da PCR.

3.6.2.1. Extração de DNA

As extrações de DNA foram realizadas de acordo com Salah & Iciar (1997), utilizando a metodologia de lise alcalina, empregada para eucariotos. Um volume de 1mL de culturas axênicas de *Acanthamoeba* spp., contendo aproximadamente 10^6 amebas/mL foi transferido para um microtubo e centrifugado à 250xg, por 10 min, sendo o sobrenadante desprezado. As células precipitadas foram suspensas em 1 mL de PBS, homogeneizadas e centrifugadas a 250xg por 3 min. Este procedimento foi repetido 3 vezes sendo assim recuperado o sedimento.

Ao sedimento obtido foi adicionado 400 μ L de tampão de extração (NaCl 0,4 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,5 mM, pH 8), 2% de sódio dodecil sulfato (SDS) e 0,4 mg/mL de proteinase K. Os tubos foram incubados em banho-maria por 1h, a 60°C. Após a incubação, 300 μ L de NaCl (6M), foram adicionados e os tubos agitados vigorosamente em vórtex por 30s e centrifugados à 10000xg por 10 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, ao qual foi adicionado igual volume de isopropanol e mantido a -20°C por

1h. A mistura foi centrifugada a 10000xg por 20 min. O sedimento resultante foi lavado com 1mL de etanol 70% e desidratado à temperatura ambiente. Após, o DNA foi ressuspensão com 100µL de água ultrapura (MilliQ), quantificado pelo método da gota e conservado a -20°C.

3.6.2.2. Reação em cadeia da polimerase

Foram utilizados os oligonucleotídeos específicos para o gênero *Acanthamoeba* de acordo com Mathers *et al.* (2000). Para a reação foram utilizados, de 20 ng a 40 ng de DNA, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo (CENBIOT™) (F: 5' GTT TGA GGC AAT AAC AGG T 3'; R: 5' GAA TTC CTC GTT GAA GAT 3'), 0,2 mM dNTPs (Mix, Invitrogen™), 50 mM KCl₂, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 1,5 mM de cloreto de magnésio e 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) para um volume final de 25 µL.

A PCR foi realizada em termociclador PTC 150 Minicycler MJ Research, como segue: desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 min, 49°C por 1 min, 72°C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 5 min.

Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), visualizados em UV. Os resultados foram registrados por câmara digital Kodak (DC 120, versão 1.0.2) e analisados pelo programa Kodak 1D, versão 3.5.2. Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA Ladder 50 pb (CENBIOT™).

3.7. Criopreservação das cepas axenizadas

As *Acanthamoeba* foram criopreservadas conforme a técnica descrita por McMillan (1989) com algumas modificações estabelecidas no laboratório de parasitologia – UFRGS. Cultura axênicas de cinco dias foram centrifugadas 250xg por 10 min. Após a contagem celular do sedimento foram preparadas diluições na proporção 10^5 células/mL e misturadas com 10 % de soro fetal bovino e 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) em um volume final de 1 mL.

Imediatamente após a adição do crioprotetor os criotubos foram acondicionados em freezer -70°C por 3 dias e depois mergulhados em nitrogênio líquido (-196°C), contido em botijão criobiológico. Após 5 dias de congelamento em nitrogênio líquido as cepas foram inoculadas em ágar não-nutriente para avaliar a sua viabilidade.

3.8. Teste de tolerância à temperatura

Os isolados de *Acanthamoeba* spp. inoculados em triplicata, em ágar não-nutriente (1,5%) com uma sobrecamada de *E. coli*, foram submetidos a três diferentes temperaturas (30°C , 37°C e 45°C). As placas foram observadas diariamente, à microscopia óptica (100X) por até 10 dias. Posteriormente, os isolados submetidos às temperaturas foram inoculados em placas de ágar não-nutriente 1,5% recobertas com *E. coli* e incubados a 30°C para avaliar sua viabilidade (Mathers *et al.*, 2000). Desta forma, estabeleceu-se empiricamente os seguintes critérios: (-) ausência de crescimento, (+) média de 1 a 5 cistos e/ou trofozoítos por campo, (++) média de 6 a 15 cistos e/ou trofozoítos por campo e (+++) média de 16 cistos e/ou trofozoítos por campo.

3.9. Análise estatística

3.9.1. Cálculo de número amostral

O critério de seleção foi a disponibilidade dos estojos por voluntários. Para o cálculo do tamanho amostral foi considerada uma prevalência esperada de 30%, segundo dados disponíveis na literatura, da presença de trofozoítos ou cistos nos estojos de lentes de contato, confiança de 95% e um erro estimado de 10%. Assim o tamanho amostral calculado foi de 81 estojos.

3.9.2. Avaliação estatística

Foram avaliados os dados de forma descritiva através de cálculo de frequência, percentual, média e desvio padrão. Para verificar possíveis fatores associados à presença de *Acanthamoeba* spp. foi realizado o teste qui-quadrado, quando as variáveis eram categóricas (como sexo, tipo de lente e as respostas sim e não), teste t de student para o tempo que usa lentes e teste de Mann-Whitney para UFC/mL relacionado com a presença de *Acanthamoeba* spp.. Todas as análises estatísticas foram realizadas no setor de estatística da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do HCPA.

3.10. Elaboração de um manual de boas práticas de conservação dos estojos de lentes de contato.

Seguindo recomendações médicas e dos fabricantes de lentes de contato foi elaborado um manual de boas práticas de conservação dos estojos de lentes de contato, o qual foi entregue a todos os usuários, participantes do estudo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos estojos e usuários de lentes de contato

a partir da análise do questionário

A síntese dos dados obtidos dos usuários de lentes de contato que participaram do estudo está apresentada na tabela 1.

	Observado (n=81)	%
N° de mulheres	58	72
N° de Homens	23	28
Idade média geral em anos	28	-
Estojo de lente rígida	35	43
Estojo de lente gelatinosa	30	37
Estojo de lente gelatinosa descartável	13	16
Estojo de lente gelatinosa+Lente Rígida	3	4
Uso terapêutico	72	88
Uso estético	9	11
Uso ocasional	8	10
Uso diário	70	86
Uso prolongado	3	4

Dos 81 indivíduos avaliados 72% (58) eram mulheres com uma idade média de 28 anos. Na população masculina a idade média era de 31 anos. As mulheres eram a maioria dos usuários, tanto para lentes rígidas (60%), como para gelatinosas (64%), incluindo descartáveis. Outro perfil bastante característico foi a idade média de cada grupo de usuárias: mulheres que utilizam lentes rígidas tinham em média, 34 anos e usuárias de lentes gelatinosas, incluindo descartáveis, tinham em média 24 anos de idade.

O uso terapêutico de lentes foi característico da maioria dos usuários (89%) e a média de idade desse grupo foi de 29 anos. Já a média de idade para as pessoas que utilizam lentes cosméticas foi de 23 anos. A população mais jovem, usuária de lentes de contato estéticas tem hábitos mais precários de higiene, que é um dos principais fatores de risco para pessoas com este perfil (Nieder Korn, 1999).

Quanto ao tipo de lente utilizada, 35 (43%) eram tipo rígida enquanto 30 (37%) eram do tipo gelatinosa. Dos 81 usuários, 13 (16%) utilizavam lentes gelatinosas do tipo descartável, cuja validade média era de um mês. De todos os usuários avaliados três (4,0%) utilizavam a sobreposição de lentes, uma lente rígida sobre uma gelatinosa.

O tempo decorrido após o início do uso de lentes de contato foi bastante variado, de 0,1 a 360 meses. Porém, foi observado que a lente era substituída com alguma frequência, pois o uso médio da mesma lente foi de 9 meses.

De todos os colaboradores, 50 (62%) tinham o hábito de procurar periodicamente o serviço de saúde para revisão médica do uso das lentes de

contato, independente de qualquer sintomatologia, enquanto 31 (38%) não o faziam. Diferente dos usuários de óculos, os usuários de lentes de contato necessitam de cuidados maiores com a saúde visual, pois podem vir a sofrer de outras complicações, como fissuras e infecções. Esta característica peculiar faz com que os usuários tenham como rotina procurar os serviços oftalmológicos, com maior frequência. O tempo médio de uso da mesma lente, entre as pessoas que admitiram fazer revisão periodicamente foi 10 meses, não diferindo muito dos usuários que não faziam revisão periodicamente, já que o tempo médio de revisão foi de 8 meses.

O manuseio das lentes, estojo e o material envolvido com a sua manutenção são fatores preponderantes para uma conservação adequada.

Quanto ao cuidado com as lentes, 59 (72%) dos indivíduos que cederam os estojos para análise, admitiram lavar as mãos antes de manipular o estojo e as lentes de contato, 3 (4%) lavavam as lentes friccionando-a com a solução de limpeza, 12 (15%), admitiram não ter qualquer cuidado ao manusear a lente de contato e 07 (9%) adotavam outros cuidados como ferver ou lavar a lente e o estojo com sabonete.

Entre os usuários de lentes de contato a falta de higiene é o maior fator de risco para ceratite amebiana. Niederkorn e colaboradores (1999) observaram que 85% dos casos de ceratite por *Acanthamoeba* spp. ocorreu com homens jovens, usuários de lentes de contato que relatavam pouca higiene e a ausência do hábito de lavar as mãos

4.2. Análise microbiológica

4.2.1. Contagem bacteriana

Dos 81 estojos avaliados 58 (71%) apresentaram crescimento de microrganismos. A média de unidades formadoras de colônias (UFC), no líquido do estojo de lentes de contato foi de $8,1 \times 10^5$ UFC/mL, em uma área média de 3 cm^2 , por estojo e cada estojo apresentou, em média quatro tipos de colônias bacterianas diferentes. Diferente do presente estudo Donzis e colaboradores (1987) que encontraram 42% de positividade em estojos de lentes de contato em um estudo realizado na Inglaterra e Wilson e colaboradores (1990) que encontraram 46% de positividade em estudo semelhante realizado na Califórnia. Porém Fleiszig & Efron (1992), em estudos realizados na Austrália se aproximaram dos nossos resultados, encontrando uma positividade de 72% de contaminação por bactérias. As recomendações médicas e dos fabricantes não limitam a presença ou ausência de microrganismos ou a quantidade de UFC.

Considerando-se a definição de Wirtanen e colaboradores (1996), de que um biofilme estaria presente quando existem entre 10^3 e 10^5 bactérias por cm^2 , podemos concluir que a maioria dos estojos analisados em nosso estudo apresentava biofilme. Esta observação é importante, pois quanto mais organizada a estrutura, maior a dificuldade de remoção da comunidade bacteriana do estojo, conseqüentemente maior é a possibilidade de contaminação microbiana das lentes e conseqüentemente dos olhos.

A comparação entre o tipo de lente e a contagem bacteriana demonstrou que os estojos de lentes rígidas apresentavam maior quantidade

de UFC por mL (10^6), enquanto os de lentes gelatinosas apresentaram menor quantidade (10^5). Contrariamente um estudo realizado por Dart (1990) encontrou maior contaminação nos estojos de lentes gelatinosas, o que é justificado pelo autor pelo fato dessas lentes possuírem um suporte maior aos microrganismos devido ao material com que elas são confeccionadas.

4.2.2. Isolamento e Identificação bacteriana

Com o meio de cultura escolhido para o isolamento inicial de bactérias (ágar sangue) foi possível recuperar 177 isolados bacterianos, sendo identificadas 51 espécies. Destas 45 (25%) eram bastonetes Gram-negativos (tabela 2), 31 (18%) bastonetes Gram-positivos (tabela 3), 45 (25%) de cocos Gram-positivos (tabela 4) e 56 (32%) cocobastonetes (tabela 5).

Os estojos de lentes de contato apresentaram uma microbiota variada, estando presentes bactérias ambientais como as do gênero *Kurthia* sp., *Listeria* sp. e *Xanthomonas* sp. Estas bactérias, até o momento não apresentam relatos de alguma patologia humana causada por elas (Alves *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1998).

Em estojos de lentes gelatinosas, gelatinosas descartáveis e rígidas, foram isoladas duas espécies de bactérias do gênero *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* e *P. alcaligenes*) (tabela 2). Estas bactérias, apesar de serem amplamente distribuídas na natureza são patógenos oportunistas de grande importância. A espécie *P. aeruginosa* está relacionada com 21% dos casos de infecção ocular associada com o uso de lentes de contato (Schirmbeck *et al.*,

2000). As demais espécies de bastonetes Gram negativos identificadas não apresentam significado clínico relatado na literatura.

TABELA 2. Bastonetes Gram negativos isolados de estojos de lentes de contato

Espécies	LGD ¹	LG ²	LR ³	LRG ⁴
<i>Burkholderia mallei</i> ^C	1 ⁵	4	-	-
<i>Burkholderia pseudomallei</i> ^C	-	1	-	-
<i>Capnocytophaga cynodegmi</i>	1	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ^C	-	-	1	-
<i>Gardnerella vaginalis</i> ^C	1	1	1	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^{A B C}	1	4	3	-
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> ^{A B C}	-	1	-	-
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	-	1	-	-
<i>Xanthomonas campestris</i>	1	4	3	-
<i>Xanthomonas fragariae</i>	-	1	1	-

1 Lente Gelatinosa Descartável;

2 Lente Gelatinosa;

3 Lente Rígida;

4 Lente Rígida e Lente Gelatinosa (sobrepostas).

5 Número de isolados

A - Mais freqüentes em endoftalmites

B - Causadora de ceratites

C - Patogênicas oportunistas

A presença de bactérias do gênero *Bacillus* (*B. cereus*, *B. circulans* e *B. pumilus*) (Tabela 3), se dá pela elevada prevalência ambiental, tanto da forma vegetativa como dos esporos. Podem fazer parte tanto da microbiota, ocular quanto do corpo. Porém as espécies isoladas não estão relacionadas com infecções oculares. A única espécie isolada em infecções desta natureza foi *B. subtilis* (Schirmbeck *et al.*, 2000).

TABELA 3. Bastonetes Gram positivos isolados de estojos de lentes de contato

Espécies	LGD ¹	LG ²	LR ³	LRG ⁴
<i>Arcanobacterium pyogenes</i> ^B	-	-	1 ⁵	-
<i>Bacillus cereus</i> ^B	-	-	1	1
<i>Bacillus circulans</i> ^B	-	1	3	1
<i>Bacillus pumilus</i> ^B	-	1	-	-
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	-	-	1	-
<i>Kurthia gibsonii</i>	-	-	2	-
<i>Kurthia sibirica</i>	-	1	-	-
<i>Kurthia zopfii</i>	-	-	1	-
<i>Streptobacillus moniliformis</i> ^{A B}	-	-	1	-
<i>Streptomyces</i> sp.	1	-	-	-
<i>Turicella otitidis</i> ^{A B}	-	-	1	-

1 Lente Gelatinosa Descartável

2 Lente Gelatinosa

3 Lente Rígida

4 Lente Rígida e Lente Gelatinosa (sobrepostas)

5 Número de isolados

A - Mais freqüentes em endoftalmites

B – Patogênicas oportunistas

Foram isoladas várias espécies do gênero *Staphylococcus* (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. Intermedius*, *S. lentus* e *S. saprophyticus*) (tabela 4). Os cocos Gram-positivos fazem parte da microbiota conjuntiva, porém *S. aureus* e *S. epidermidis* são encontrados causando infecções oftálmicas também (Alves *et al.*, 1991; Vieira *et al.*, 1999; Kaufman *et al.*, 2000). É importante observar que os usuários de lentes que participaram do presente estudo eram assintomáticos para infecções oculares, porém a presença destes microrganismos nos estojos é um fator predisponente para infecções.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* têm uma história evolutiva relacionada com o hospedeiro, pois apresentam uma distribuição ambiental bastante limitada e são isoladas em vários mamíferos. Têm uma relação de comensalismo e vivem nas cavidades dos animais. Esta proximidade faz com que haja pressões evolutivas sobre elas, como o uso de medicamentos e as mudanças ambientais, selecionando cepas com maior resistência a antimicrobianos e maior patogenicidade (Palumbi, 2001). No momento da avaliação nenhum dos pacientes apresentava sintomas de infecção, desta forma, não foi possível estabelecer nenhuma relação entre a presença de cocos e patologias.

TABELA 4. Cocos Gram-positivos isolados de estojo de lentes de contato

Espécies	LGD ¹	LG ²	LR ³	LRG ⁴
<i>Alloiococcus otitidis</i> ^C	-	1 ⁵	-	-
<i>Deinococcus radiophilus</i>	-	1	1	-
<i>Enterococcus faecium</i> ^{B C}	1	1	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	1	-
<i>Micrococcus lylae</i>	-	-	1	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ^{A B C}	-	2	8	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ^{A B C}	-	2	1	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ^C	-	1	1	-
<i>Staphylococcus Intermedius</i> ^C	2	1	-	-
<i>Staphylococcus lentus</i> ^C	1	1	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ^C	1	1	-	-

1 Lente Gelatinosa Descartável

2 Lente Gelatinosa

3 Lente Rígida

4 Lente Rígida e Lente Gelatinosa (sobrepostas)

5 Número de isolados

A - Mais freqüentes em endoftalmites

B - Causadora de ceratites

C - Patogênicas oportunistas

As bactérias do gênero *Corynebacterium* são amplamente distribuídas no ambiente e fazem parte da microbiota humana, inclusive da conjuntiva. São patógenos oportunistas, também causando conjuntivites e endoftalmites (Tabela 5) (Salvanet-Bouccara *et al.*, 1992; Euzéby, 2008).

TABELA 5. Cocobastonetes Gram positivos isolados estojo de lentes de contato.

Espécies	LGD ¹	LG ²	LR ³	LRG ⁴
<i>Brevibacterium casei</i> ^C	-	-	1 ⁵	1
<i>Brevibacterium epidermidis</i>	-	2	1	-
<i>Brevibacterium iodinum</i>	1	-	-	-
<i>Brevibacterium linens</i>	1	-	1	-
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> ^{AC*}	-	1	-	-
<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i> ^{AC*}	-	3	1	1
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> ^{AC*}	-	-	2	-
<i>Corynebacterium xerosis</i> ^{AC*}	-	-	1	1
<i>Dermabacter hominis</i>	-	1	1	-
<i>Jonesia denitrificans</i>	-	-	1	-
<i>Kocuria rosea</i> ^C	-	-	1	-
<i>Listeria grayi</i>	-	-	2	-
<i>Listeria innocua</i>	-	3	5	-
<i>Listeria seeligeri</i>	1	1	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>	-	-	1	-
<i>Microbacterium arborescens</i>	-	-	2	-
<i>Microbacterium lacticum</i>	-	-	1	-
<i>Moraxela osloensis</i> ^C	-	1	-	-
<i>Nesterenkonia halobia</i>	-	-	3	-

1 Lente Gelatinosa Descartável;

2 Lente Gelatinosa;

3 Lente Rígida;

4 Lente Rígida e Lente Gelatinosa (sobrepostas).

5 Número de isolados

A - Mais freqüentes em endoftalmites

B - Causadora de ceratites

C - Patogênicas oportunistas

* Bactéria com capacidade de invadir a conjuntiva.

De todos os microrganismos isolados *C. diphtheriae* seria o único capaz de invadir a conjuntiva sadia e causar infecções nas estruturas oculares (Schirmbeck *et al.*, 2000). O colaborador, de cujo estojo foi isolado *C.*

diphtheriae, era assintomático. A quantificação foi de 10 UFC/mL e não foram isolados outros microrganismos em seu estojo.

4.2.3. Comparação microbiológica entre os grupos de acadêmicos da UFRGS e pacientes do HCPA.

Ao dividir os voluntários por procedência (setor de oftalmologia do HCPA ou Campus central da UFRGS) pode-se observar a formação de dois grupos distintos, como mostra a figura 8.

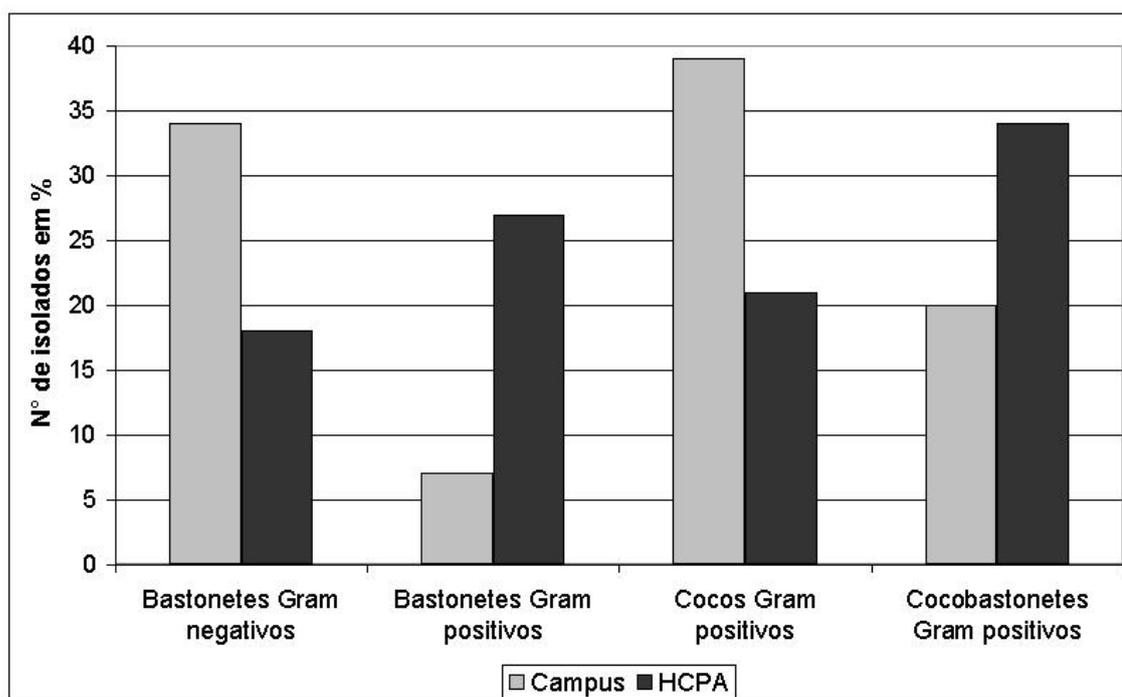


FIGURA 8. Comparação da microbiota existente em 81 estojos de lentes de contato de voluntários, segundo o tipo de voluntário. Porto Alegre, 2008.

Para esta análise agrupou-se os voluntários em duas populações distintas: uma formada por alunos do campus central da UFRGS, com idade média de 23 anos, sendo destes 30 (81%) mulheres e outro por pacientes do

setor de oftalmologia do HCPA com idade média de 31 anos, sendo 29 (67%) mulheres.

O grupo formado por acadêmicos era constituído basicamente por mulheres jovens, usuárias de lentes cosméticas. Como observado (figura 8) os bastonetes Gram negativos e cocos Gram positivos foram mais freqüentes na população de acadêmicos, enquanto os bastonetes Gram positivos e cocobastonetes Gram positivos foram mais freqüentes na população de pacientes do setor de oftalmologia do HCPA.

Dentre todos os grupos bacterianos isolados na população do Campus os bastonetes Gram negativos e cocos Gram positivos apresentaram uma maior riqueza. As bactérias isoladas na população de estudantes são mais freqüentemente isoladas na microbiota corporal e estão mais relacionadas com patologias. No grupo formado por pacientes do HCPA a maior riqueza foi representada por bastonetes Gram positivos e cocobastonetes, que são bactérias isoladas mais freqüentemente no meio ambiente (Salvanet-Bouccara *et al.*, 1992; Euzéby, 2008). Este resultado é corroborado por Niederkorn (1999), que concluiu que os jovens, optantes por lentes coloridas como recurso estético, possuem hábitos precários de higiene implicando em mais infecções.

4.3. Antibiograma com as bactérias isoladas dos estojos de lentes de contato

Para a avaliação da susceptibilidade das espécies isoladas foram selecionados os antibióticos mais comumente utilizados na rotina clínica. Os resultados estão apresentados nas tabelas em anexo (III, IV, V e VI).

Nenhum dos antimicrobianos testados foi eficiente contra todos os microrganismos isolados, o que é esperado devido à variação de susceptibilidade entre cepas e espécies. No presente estudo, a maior resistência foi observada para macrolídeos e vancomicina, fato já esperado, pois estes antimicrobianos são mais eficientes contra bactérias Gram-positivas.

Para o tratamento de infecções ser considerado eficaz observa-se a sensibilidade plena dos microrganismos frente ao antimicrobiano, não sendo os resultados intermediários e resistentes considerados bons. Cefalotina e estreptomicina foram os antimicrobianos que tiveram menos ação entre os isolados testados. Amoxicilina mostrou-se o mais eficiente para uma maior quantidade de isolados, entre os bastonetes Gram negativos (ANEXO III).

Houve uma grande variação entre isolados de uma mesma espécie. Dois de três isolados de *G. vaginalis* apresentaram o mesmo perfil de resistência.

P. aeruginosa apresentou grande variação entre isolados, onde a maioria apresentou resistência a mais de quatro antimicrobianos. Dois destes isolados apresentaram resistência a nove dos 10 antimicrobianos testados, considerando os resultados intermediários. Esse resultado é importante, pois essa espécie é frequentemente isolada de infecções intra-oculares, juntamente com *E. coli* e *G. vaginalis* (Liesegang, 1997; Stein *et al.*, 1995).

As espécies *B. mallei* e *B. pseudomallei* encontradas em nosso estudo são bactérias de importância veterinária e médica por causar infecções, sendo consideradas como agentes com potencial para o bioterrorismo, além de

apresentarem resistência a diversos antimicrobianos (Neubauer *et al.*, 1997; Heine *et al.*, 2001). Porém, estas bactérias não têm sido relacionadas a complicações oftálmicas.

Os resultados dos antibiogramas com o grupo dos bastonetes Gram-positivos estão sintetizados (ANEXO IV).

Nenhum dos antimicrobianos foi eficiente contra todos os microrganismos, porém cloranfenicol foi mais eficiente, sendo 15 isolados sensíveis a ele. Amoxicilina e cefalotina, também apresentaram uma boa eficiência. Ambos mostraram-se eficientes para 14 isolados.

Comparando-se com os bastonetes Gram negativos, em geral, os bastonetes Gram positivos foram mais sensíveis a todos os antibióticos. Apenas uma cepa de *B. circulans* foi sensível a todos os antimicrobianos, as demais cepas deste gênero não foram plenamente sensíveis a todos os antimicrobianos, se considerarmos os valores intermediários.

Estudos realizados na Índia por Anand e colaboradores (2000), avaliando isolados de endoftalmite e de infecções oculares concluíram que os bastonetes Gram positivos apresentaram 11 % de resistência à gentamicina e 100 % de sensibilidade à vancomicina, nos casos de endoftalmite.

Os resultados dos antibiogramas com os cocos Gram positivos estão apresentados no anexo V.

Todas as cepas foram sensíveis a amoxicilina. Cloranfenicol, gentamicina e vancomicina foram eficientes em 75% ou mais dos isolados testados. O ácido nalidíxico e a eritromicina foram os antimicrobianos menos eficientes.

No grupo dos cocos Gram positivos estão os microrganismos como *S. aureus* e *S. epidermidis* que também pertencem a microbiota ocular e que são mais freqüentemente isolados em infecções oculares (Limberg, 1991). Em um estudo realizado por Meneghetti & Salla (2004) foi observada uma maior resistência à cefalotina, considerando os resultados intermediários. No presente estudo 50% dos isolados foram resistentes a este antibiótico, considerando a suscetibilidade intermediária.

Das cepas de *S. aureus* três apresentaram resistência a vancomicina, sendo dois com susceptibilidade intermediária. Infecções causadas por cepas de *S. aureus* resistentes à vancomicina são de grande relevância, pois este antibiótico é de última escolha no tratamento de infecções com estas bactérias, além da possibilidade de disseminação destas cepas entre as pessoas (Alves *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 2003). Alguns estudos demonstram que *S. aureus* com resistência à vancomicina já foram isolados em culturas de material ocular, sem que houvesse algum sintoma presente (Kato *et al.*, 1999; Fukuda *et al.*, 2002). Outras infecções causadas por *S. aureus*, principalmente as transmitidas por catéter vascular causam quadros de septicemia, levando o paciente ao óbito (Hiramatsu *et al.*, 1997).

Os resultados dos antibiogramas com os cocobastonetes Gram positivos estão apresentados no anexo VI.

Nenhum dos antimicrobianos foi plenamente eficiente contra todas as cepas, porém foi observada menor resistência à amoxicilina e cloranfenicol.

Os cocobastonetes Gram positivos apresentaram maior resistência à rifampicina seguido por vancomicina, estreptomicina eritromicina.

Dos grupos morfológicos avaliados os cocobastonetes Gram positivos apresentaram uma menor resistência ou suscetibilidade intermediária aos antibióticos testados. Quatro isolados foram plenamente sensíveis a todos os antibióticos (*M. arborexens* e *N. halobia*).

4.4. Caracterização do usuário AVL positivo

Dos 81 estojos de lentes de contato avaliados 7 (9%) estavam contaminados com AVL, sendo um isolado proveniente de estojo de lentes gelatinosas descartáveis (LGD), dois de lentes gelatinosas (LG) e quatro de lentes rígidas (LR).

A avaliação demonstrou que a idade média dos usuários de lentes de contato com estojo AVL positivos foi de 31 anos e que os estojos contaminados com amebas pertenciam a usuários que utilizavam lentes de contato há mais tempo (117 meses em média).

Quanto às medidas de higiene, os estojos AVL positivos pertenciam a indivíduos que não mostraram preocupação com a higiene das mãos. Desses, quatro relataram lavar as mãos esporadicamente antes do manuseio das lentes e dois admitiram não adotar nenhuma medida de higiene própria ou com os estojos de lentes de contato.

Estudos realizados na Coreia demonstram que a presença de AVL em estojos de lentes de contato pode variar entre 10 e 16% (Lee *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2001). Outro estudo avaliando estojos de lentes de contato, na Inglaterra, encontrou uma prevalência de 20% para AVL e 8 % para *Acanthamoeba* spp. (Gray *et al.*, 1995).

A importância da demonstração da presença de AVL em estojos de lentes de contato ou em soluções de manutenção, está no fato da presença do protozoário nestes locais ser um dos grandes fatores de risco predisponentes à ceratite (Epstein *et al.*, 1986).

4.5. Avaliação microbiológica dos estojos AVL positivos

Os estojos que apresentaram AVL, tiveram um valor mediano de 10^7 UFC/mL contra 10^5 UFC/mL dos casos negativos. O grupo morfológico de maior frequência nos estojos de onde foram isoladas AVL foi o dos cocobastonetes Gram positivos, seguido pelos bastonetes Gram-negativos.

Observou-se uma diferença significativa entre a maior quantidade de UFC/mL e a presença de *Acanthamoeba* spp., como esperado ($p=0,008$), porém a mesma relação não foi estabelecida entre os diferentes tipos de lentes. A maior riqueza bacteriana propicia um micro-habitat favorável para as AVL, que utilizam estas bactérias como fonte de nutrientes (Barbeau & Buhler 2001).

4.5.1. Comparação entre os grupos de acadêmicos da UFRGS e pacientes do HCPA.

Cinco dos sete isolados de AVL foram procedentes de estojos de voluntários do Campus central da UFRGS, formada por acadêmicos com idade média de 23 anos. Dos voluntários do Campus central da UFRGS, 25 eram mulheres, todas usuárias de lentes de contato cosméticas gelatinosas. A população com estas características é mais susceptível a infecções oculares

por AVL ou qualquer outro microrganismo, pois existem vários fatores de risco relacionados a ela. Da população formada por pacientes do HCPA, 34 são mulheres, sendo 11 dessas usuárias de lentes gelatinosas. Em estudos realizados por Niderkorn e colaboradores (1999) e Beattie e colaboradores (2003). foi observado que indivíduos jovens que fazem uso de lentes gelatinosas cosméticas, em geral, apresentam hábitos de higiene inadequados para a manutenção de todos os materiais envolvidos no uso de lentes de contato.

4.6. Identificação do gênero *Acanthamoeba* spp.

Em sete dos 81 estojos avaliados foram isolados AVLs com morfologia sugestiva de pertencer ao gênero *Acanthamoeba* spp. de acordo com Page (1988) (tabela 6). Os isolados foram identificados como 18M (a, b), 20P, 30G, 32s (a, b), 45M, 48L e 78 (a,b) (Figuras 10 a 16).

A classificação por grupos (GI, GII e GIII) leva em consideração as características morfológica dos cistos proposta por Pussard & Pons (1977).

Os isolados 18M, 32S e 78L apresentaram diferentes morfologias císticas, sendo que o isolado 18M apresentou cistos característicos do G I (18Ma) e II (18Mb). Já o isolado 32S apresentou cistos com característica do GI (32Sa) e III (32Sb) e o isolado 78L apresentou dois tipos de cistos com características do GII (78La e 78Lb). Isto pode ser explicado pela presença de mais de uma espécie do gênero, ocorrendo simultaneamente em um mesmo estojo. Os demais isolados apresentaram características dos grupos morfológicos: GIII (20P), GII (30G), GII (45M) e GII (48L).

TABELA 6. Caracterização morfológica dos cistos de *Acanthamoeba* spp. isolados de usuários de lentes de contato

Isolado	Morfologia cística (n=20)*						Provável Grupo	
	Diâmetro médio do cisto	Desvio padrão	Número médio de Braços	Forma do endocisto	Espessura do ectocisto	Textura do ectocisto		
18M	18Ma	24 µm	4 µm	7	Estrelado	Espesso	Liso	I
	18Mb	18 µm	3 µm	4	Poligonal	Espesso	Ondulado	II
20P		18 µm	3 µm	4	Pequenos ângulos	Delgado	Rugoso	III
30G		21 µm	4 µm	4	Poligonal	Médio	Ondulado	II
32S	32Sa	23 µm	5 µm	8	Estrelado	Espesso	Liso	I
	32Sb	18 µm	2 µm	4	Redondo	Delgado	Rugoso	III
45M		17 µm	2 µm	3	Poligonal	Médio	Ondulado	II
48L		18 µm	3 µm	4	Poligonal	Médio	Ondulado	II
78L	78La	21 µm	3 µm	6	Estrelado	Espesso	Ondulado	II
	78Lb	20µm	2 µm	4	Poligonal	Médio	Ondulado	II

* Os dados foram obtidos a partir da análise de 20 cistos isolados.

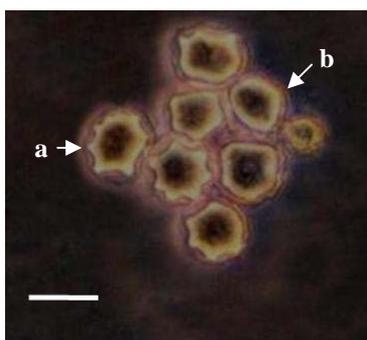


FIGURA 9. Isolado de AVL 18M. a) GI; b) GII (200X; barra=24 μ m)

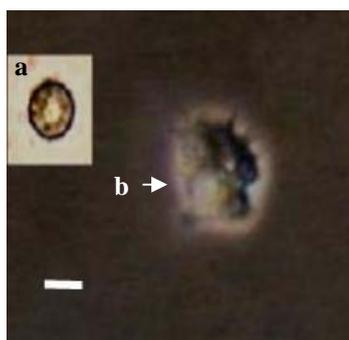


FIGURA 10. Isolado de AVL 20P. a) cisto; b) trofozoito GIII (200X; barra=18 μ m)

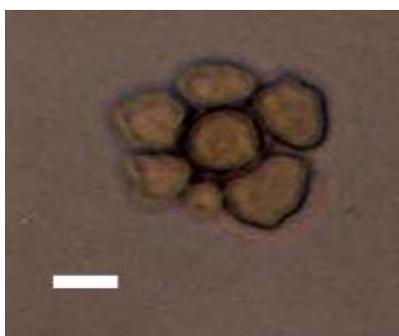


FIGURA 11. Isolado de AVL 30G. Cisto característico do GII (200X; barra= 20 μ m)

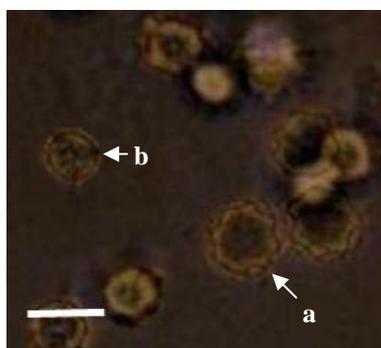


FIGURA 12. Isolado de AVL 32S. a) GI; b) GIII (200X; barra= 23 μ m)



FIGURA 13. Isolado de AVL 45M. Trofozoito e cisto característico do GII. (200X; barra= 17 μ m)

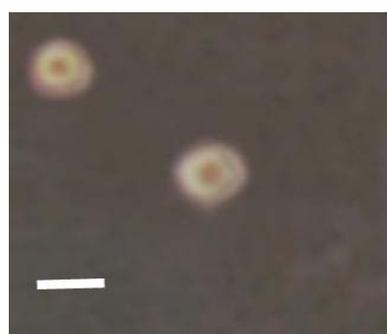


FIGURA 14. Isolado de AVL 48L. Cisto característico do GII. (200X; barra= 18 μ m)

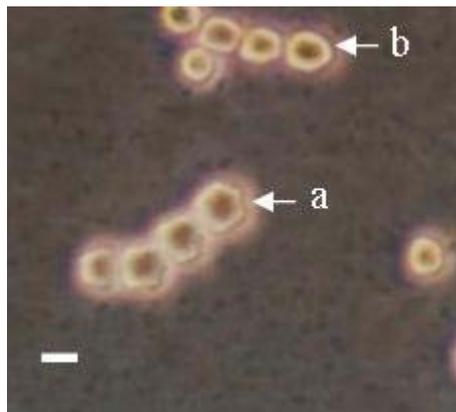


FIGURA 15. Isolado de AVL 78L. Diferentes espécies do *Acanthamoeba* spp. a) GII; b) GII. (200X; barra= 21 μ m)

4.6.1. Teste de exflagelação das AVL

O teste de exflagelação foi negativo para as sete AVL isoladas dos estojos de lentes de contato, o que exclui a possibilidade das AVL serem *Naegleria fowleri*, que ao serem submetidas a situações como a privação de nutrientes, passam por transformações morfogênicas como o surgimento do flagelo. Esta transformação é um estágio transitório, com o metabolismo reduzido e sem divisão celular e acredita-se que esse flagelo seja usado para que a ameba possa se dispersar pelo ambiente em busca de condições favoráveis (Schuster & Visvesvara, 2004b).

A presença de *Naegleria fowleri* em estojos de lentes de contato não tem significado clínico, enquanto *Acanthamoeba* spp. tem o potencial de causar ceratites. (Schuster, 2002).

4.6.2. Confirmação do gênero *Acanthamoeba* spp.

A confirmação do gênero *Acanthamoeba* foi realizada através da reação de PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para este gênero, como descrito anteriormente em materiais e métodos. Os resultados da PCR podem ser visualizados na figura 1.

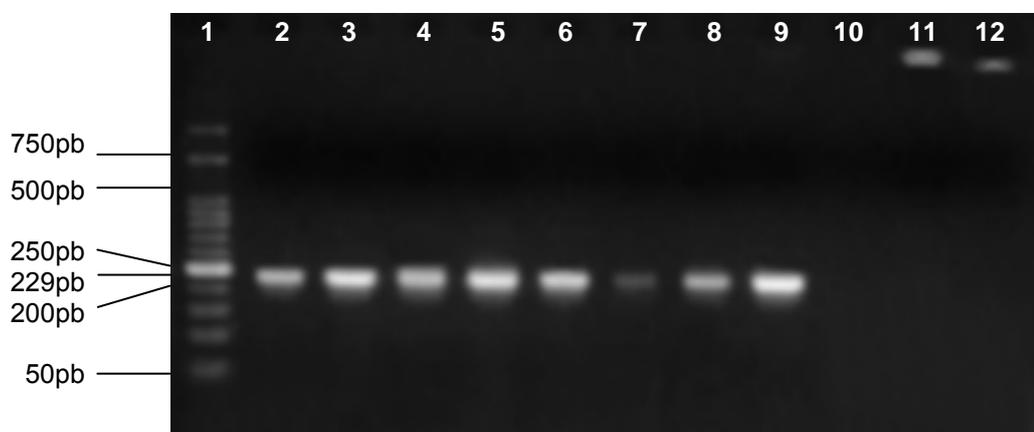


FIGURA 16. Análise molecular do gene ssu rDNA 18S. 1. Marcador de peso molecular (50pb); 2. 18M; 3. 20P; 4. 30S; 5. 32M; 6. 45L; 7. 48L; 8. 78L; 9. C+; 10. C-; 11. DNA *E. coli* e 12. DNA do contaminante.

Com a PCR foi possível confirmar que dentre os isolados de AVL haviam sete amebas pertencente ao gênero *Acanthamoeba* spp., porém como observado através da identificação morfológica nos isolados 18M, 32S e 78L estariam presentes diferentes espécies de *Acanthamoeba*, não sendo possível diferenciar as duas espécies presentes no mesmo isolado. O teste morfológico indica que ambas são sugestivas de pertencer ao gênero *Acanthamoeba* e a PCR confirma que entre elas há pelo menos uma pertencente a este gênero.

A axenização do isolado 78L não foi possível devido a contaminação persistente de um bastonete Gram negativo. Para confirmar que a PCR não amplificaria material genético desta bactéria foi extraído seu DNA e submetido à reação, utilizando os mesmos oligonucleotídeos, não tendo ocorrido amplificação (canaleta 12). Na literatura é freqüente o relato das dificuldades em axenizar determinados isolados de AVL, principalmente em amostras ambientais (Tsvetkova *et al.*, 2004), além disso, existem alguns isolados de *Acanthamoeba* spp. que são difíceis de se multiplicar em meio PYG, necessitando assim de meios mais enriquecido (Schuster, 2002).

A PCR apresenta sensibilidade e especificidade elevadas para o diagnóstico de AVL, sendo utilizado tanto para diagnóstico confirmatório de patologias como para diagnósticos ambientais (Mathers, *et al.*, 2000; Tsvetkova *et al.*, 2004).

4.7. Teste de tolerância à temperatura.

Os isolados foram testados quanto a sua capacidade de crescer em diferentes temperaturas (30°C, 37°C e 45°C) (tabela 7)

Na temperatura 30°C todos os isolados apresentaram bom crescimento e todos permaneceram viáveis em todas as avaliações, esta temperatura foi utilizada como controle positivo por ser a temperatura ótima de crescimento (Neff *et al.*, 1969).

TABELA 7. Teste de tolerância de *Acanthamoeba* spp. a diferentes temperaturas.

Isolado	Crescimento em diferentes temperaturas*		
	30°C	37°C	45°C
18M	+++	++	++
20P	+++	+++	+
30G	+++	-	-
32S	+++	+++	-
45M	+++	+++	+++
48L	+++	+++	+++
78L	+++	-	-

- ausência de crescimento, média de + 1 a 5 cistos e/ou trofozoítos, ++ 6 a 15 cistos e/ou trofozoítos e +++ > 16 cistos e/ou trofozoítos.

Avaliação feita em 10 campos microrcópicos (100X).

Outros estudos semelhantes ao apresentado no presente trabalho, já foram realizados por diferentes autores. Silva & Rosa (2003) submeteram 51 isolados hospitalares de *Acanthamoeba* spp. a diferentes temperaturas (37°C e 42°C) sendo apenas um isolado resistente a 42 °C. Em 2002, Schuster usou amostras clínicas para isolar AVL, utilizando a temperatura de 37°C em ANN (1,5%) e *E. coli* inativadas pelo calor, em seguida os isolados foram submetidos a teste de viabilidade (cultura monoxênica a 30°C) e o desencistamento ocorreu em dois dias. Segundo Kingston & Warhurst (1969) amebas sensíveis a temperaturas superiores a 37°C seriam capazes de causar infecção.

Os isolados de estojos de lentes de contato testados no presente estudos apresentaram maior resistência à elevação de temperatura que isolados ambientais testados por Carlesso e colaboradores (2006). Este fenótipo pode ser uma importante característica para a diferenciação entre cepas patogênicas e não patogênicas, porém em outros trabalhos os resultados divergem quanto a esta conclusão, pois apesar de haver uma

correlação entre temperatura e patogenicidade os mecanismos não ficaram estabelecidos (Khan *et al.*, 2002; Silva & Rosa,2003; Schuster & Visvesvara 2004a).

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A partir do presente estudo pode-se concluir o seguinte:

Os usuários que não observam as recomendações de conservação do estojo de lentes de contato apresentaram maior possibilidade de contaminação no seu estojo de lentes de contato.

Os estojos de quatro tipos de lentes de contato avaliados apresentaram contaminação, sendo que os estojos mais contaminados foram os de lentes de contato rígidas.

As bactérias mais comumente isoladas na conjuntiva, como os cocos Gram positivos, apresentaram maior resistência aos antimicrobianos.

As AVL do gênero *Acanthamoeba* ocorreram em 9% dos estojos, que podem conter concomitantemente mais de uma espécie. A presença das amebas está relacionada com maior UFC/mL e ocorreu mais em indivíduos jovens.

Os isolados do presente estudo serão futuramente testados quanto a sua patogenicidade *in vivo*, serão avaliados para determinar o seu genótipo e relacionar com sua virulência, além de serem analisados quanto à produção de proteases e possível correlação com seu potencial patogênico.

Os isolados serão também analisados para a determinação da presença de possíveis endossimbiontes.

O PCR é uma boa metodologia para confirmação do gênero *Acanthamoeba* spp.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M. R.; ORÉFICE, F.; GONÇALVES, N. P.; VILA, M. F. Norfloxacin a 0,3% no tratamento das conjuntivites e blefarconjuntivites agudas. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, São Paulo, v. 54, n. 8, p. 206-212, 1991.

ANAND, A. R; THERESE, K. L.; MADHAVAN, H. N. Spectrum of aetiological agents of postoperative endophthalmitis and antibiotic susceptibility of bacterial isolates. **Indian Journal Ophthalmology**, Chennai, v. 48, n. 2, p. 123–128, 2000.

ASWAD, M. I.; BARZA, M.; BAUM, J. Effect of lid closure on contact lens-associated *Pseudomonas* Keratitis. **Archive Ophthalmology**, Boston, v. 70, n. 7, p. 107-166, 1989.

BARBEAU, J.; BUHLER, T. Biofilmes augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. **Research in Microbiology**, Paris, v. 152, n. 8, p. 753 - 760, 2001.

BEATTIE, T. K.; TOMLINSON, A.; McFADYEN, A. K.; SEAL, D. V.; GRIMASON, A. M. Enhanced attachment of *Acanthamoeba* to extended-wear silicone hydrogel contact lenses: a new risk factor for infection?. **Ophthalmology**, Glasgow, v. 110, n. 4, p. 765–771, 2003.

BRÜCKNER, D.; GARCIA, L.S. Diagnostic Medical Parasitology. 2^aed. Washington. **American Society for Microbiology**, 1993.

CARLESSO, A. M.; Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambiente do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.[dissertação de mestrado]. Porto Alegre: **UFRGS**; 2006, p. 59.

CHANG, S.; SIEVERT, D. M.; HAGEMAN, J. C.; BOULTON, M. L.; TENOVER, F. C.; DOWNES, F. P.; SHAH, S.; RUDRIK, J. T.; PUPP, G. R.; BROWN, W. J.; CARDO, D.; FRIDKIN, S. K. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. **New England Journal Medical**, Atlanta, v. 348, n. 14, p. 1342-1347, 2003

CHENG, K. H.; LEUNG, S. L.; HOEKMAN, H. W.; BEEKHUIS, W. H.; MULDER, P. G. H.; GEERARDS, A. J. M.; KIJLSTRA, A. Incidence of contactlens-associated microbial keratitis and its related morbidity. **Lancet**. The Netherlands. v. 35, n. 4: 181–185, 1999.

CLARKE, D. W.; NIEDERKORN, J. Y. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. **Trends in Parasitology**, Dallas, v. 22, n. 4, p. 175-180, 2006.

COOKE, P. *Acanthamoeba* Keratitis: ASCRS Infectious Disease Task Force Report and Recommendations [homepage na internet]. **Washington**. The American Society of Cataract and Refractive Surgery. [atualizada em Janeiro de 2008. Acesso em: janeiro de 2008]. Disponível em: http://www.ascrs.org/press_releases/images/acanth_ring_late_Fig_2_3.jpg

CORLISS, J. O. Classification of protozoa and protists: the current status. In: COOMBS, G. H.; VICKERMAN, K.; SLEIGH, M. A.; WARREN, A. Evolutionary relationships among protozoa. 3^a ed. The Netherlands: **Kluwer Academic Publishers**; 1998, p. 409 – 447.

DANGELO, J. G & FATTINI, C. A. 2004. Anatomia Humana sistêmica e segmentar para o estudante de medicina. 2^a ed. São Paulo: **Editora Ateneu**; 2004, p. 164–166.

DART, J. Contamination of contact lens storage cases. **British journal Ophthalmology**, Brisbane, n. 74, n. 3, p. 129-132, 1990.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A.; Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. **Microbiology and molecular biology reviews**, Burlington, v. 64, n. 4, p. 847–867, 2000.

De CARLI, G. A. Exame de outros espécimes do trato intestinal e sistema urogenital. In: De Carli. Parasitologia Clínica. Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. 2^a ed. Rio de Janeiro: **Atheneu**; 2001. p. 156-206.

DE JONCKHEERE, J. F. Epidemiological typing of *Acanthamoeba* strains isolated from Keratitis cases in Belgium. **Societ Belge Ophtalmology**, Brussel, v. 28, n. 7, p. 27-33, 2003.

DIXIE, F. Keeping an Eye on Contact Lenses: Safety, Options Shape Contact Lens Decisions. [homepage na internet]. Farmington Hills: U.S. Food and Drug Administration: FDA Consumer. [atualizada em Agosto de 1998, Acesso em: Agosto de 2007]. Disponível em: http://www.fda.gov/fdac/features/1998/298_lens.html

DONZIS, P. B.; MONDINO, B. J.; WEISSMAN, B. A.; BRUCKNER, D. A. Microbial contamination of contact lens care systems. **American Journal Ophthalmology**, California, v. 104, n. 4, p. 325-33, 1987.

DUDLEY, R.; MATIN, A.; ALSAM, S.; SISSONS, J.; MAHSOOD, A. H.; KHAN, N. A. *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 but not T7 encyst in response to increased osmolarity and cysts do not bind to human corneal epithelial cells. **Acta Tropica**, London, v. 95, n. 2, p. 100–108, 2005.

EFRON, N. Historical perspective. In: Nathan Efron. Contact Lens Practice. 1 ed. Melbourne: Butterworth-Heinemann Medical; 2002, p. 3–10.

ENGLER, K. H.; WARNER, M.; GEORGE, R. C. In vitro activity of ketolides HMR 3004 and HMR 3647 and seven other antimicrobial agents against *Corynebacterium diphtheriae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 47, p. 27-31, 2001.

EPSTEIN, R. J.; WILSON, L. A.; VISVESVARA, G. S.; PLOURDE, E. G. Rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis from corneal scrapings using indirect fluorescent antibody staining. **Archives Ophthalmology**, London, v. 104, n. 9, p. 1318–1321, 1986.

EUZÉBY, J. P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: LPSN [periódico na internet], jan 2008 [acesso em novembro 2007]; 47, 590-592. Disponível em: <http://www.bacterio.net>

FLEISZIG, S. J.; EFRON, N. Microbial flora in eyes of current and former contact lens wearers. **Journal of Clinical Microbiology**, Parkville, v. 30, n. 5, p. 1156–1161, 1992.

FRITSCHÉ, T. R.; GAUTOM, R. K.; SEYEDIRASHTI, S.; BERGERON, D. L.; LINDQUIST, T. D. Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. **Journal Clinical Microbiology**, Seattle, v. 31, n. 5, p. 1122-1126, 1993.

FUKUDA, M.; OHASHI, H.; MATSUMOTO, C, **Mishima S, Shimomura Y.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase negative *Staphylococcus* ocular surface infection: efficacy of chloramphenicol eye drops. **Cornea**, Osaka-Sayama, v. 21, n. 7, p. 86-89, 2002

FUTUYMA, D. J. Biologia Evolutiva. 2^a ed. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**; 1992. p. 207.

GARATE, M.; MARCHANT, J.; CUBILLOS, I.; CAO, Z.; KHAN, N. A.; PANJWANI, N. *In Vitro* Pathogenicity of *Acanthamoeba* is associated with the expression of the mannose-binding protein. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Boston, v. 47, n. 3, p. 1056–1062, 2006.

GAST, R. J. Development of *Acanthamoeba*- specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Woods Hole, v. 48, n. 6, p. 609 – 615, 2001.

GRAY, T. B.; CURSONS, R. T. M.; SHERWAN, J. F.; ROSE, P. R. *Acanthamoeba*, bacterial, and fungal contamination of contact lens storage cases. **British Journal of Ophthalmology**, Auckland, v. 79, p. 601-605, 1995

HADAS, E., MAZUR, T. Proteolytic enzymes of pathogenic and non-pathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. **Tropical Medical Parasitology**, Poznan, v. 44, n. 3, p. 197–200, 1993.

HAMILTON, W. J. Tratado de Anatomia Humana. 2ª ed. Rio de Janeiro: **Interamericana Ltda**; 1982. 688p.

HARGRAVE, S. C.; Mc CULLEY, J. P.; HUSSEINI, Z. Redugs of a trial of Combines Propamide Isethionate and Neomycin Therapy for *Acanthamoeba* Keratitis. **Ophthalmology**, Wales, v. 106, n. 5, p. 952–956, 1999.

HE, Y.; JERRY, Y.; NIEDERKORN, J. Y.; MCCULLEY, G. L.; STEWART, D.R.; MEYER, R. S.; DOUGHERTY, J. In vivo and in vitro collagenolytic activity of *Acanthamoeba castellanii*. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Dallas, v. 31, n. 11, p. 2235–2240, 1990.

HEINE, H. S.; ENGLAND, M. J.; WAAG, D. M.; BYRNE, W. R. In vitro antibiotic susceptibilities of *Burkholderia mallei* (causative agent of glanders) determined by broth microdilution and E-test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Frederick , v. 45, n. 7, p. 2119–2121, 2001.

HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; INO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T.; TENOVER, F. C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain which reduced vancomycin susceptibility. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, Tokyo, v. 40, p. 135 -136, 1997.

HOLT, H. G; KRIEG, N. R; SNEATL, P. H; SOLEY, J. T; WILLIAMS, S. T. *Bergey's Manual of Determinate Bacteriology*. 9ªed. Baltimore: **Willians and Wilkins**; 2001, 787p.

HUSTON, C. D. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. **Trends in Parasitology**, Dallas, v. 20, n. 1, p. 23–26, 2004.

ILLINGWORTH, C. D., COOK, S. D. *Acanthamoeba* Keratitis. **Survey of Ophthalmology**, Brookline, v. 42, n. 6, p. 493–508, 1998,

JENKINSON, H. F.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Biofilms adhere to stay. **Trends Microbiology**, Exeter, v. 9, n. 1, p. 9-10, 2001.

KATO, T.; HAYASAKA, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* from conjunctivas of preoperative patients. **Japanese Journal of Ophthalmology**. Toyama, v. 42, n. 5, p. 461-465. 1999

KAUFMAN, H. E; BARRON, B.E; McDONALD, M. B; KAUFMAN, S. C. Bacterial Keratitis. 3^a ed. Boston: **Companion Handbook to the Cornea**; 2000. p. 91-141.

KINGSTON, D.; WARHURST, D. C. Isolation of amoebae from the eye. **Journal Medical Microbiology**, London, v. 2, p. 27-36, 1969.

KHAN, N.A.; JARROLL, E. L.; PAGET, T. A. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. **Current Microbiology**. New York, v. 43, n. 3, p. 204–208, 2001.

KHAN, N. A; JARROLL, E. L; PAGET, T. A. Molecular and physiological differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba*. **Current Microbiology**, New York, v. 45, n. 3, p. 197–202, 2002.

KHAN, N. A. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 34, p. 277-285, 2003.

KHOSRAVI, A. D.; MEHDINEJAD, M.; HEIDARI, M. Bacteriological findings in patients with ocular infection and antibiotic susceptibility patterns of isolated pathogens. **Singapore Medical Journal**, Singapura, v. 48, n. 8, p. 741-748, 2007.

KNOP, N; KNOP, E. Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue in the Human Eye. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. Hannover, v. 41, v. 3, p. 1270-1279, 2000.

KYAW, C. M. Biofilmes Microbianos. UFB. [periódico na internet]. 2006 jun [acesso em: 20 de abril de 2006], [9p]. Disponível em: <http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/biofilme/biofilme.html#indice>.

LARKIN, D. F.; KILVINGTON, S.; EASTY, D. L. Contamination of contact lens storage cases by *Acanthamoeba* and bacteria. **British Journal of Ophthalmology**, Bristol, v. 74, n. 3, p. 133-135, 1990.

LEVEY, S. B.; KATZ, H. R.; ABRAMS, D. A.; HIRSCHBEIN, M. J.; MARSH, M. J. The role of cultures in the management of ulcerative keratitis. **Cornea**, New York, v. 16, p. 383-386, 1997.

- LEE, S. M.; CHOI, Y. I.; CHUNG, D. I. Contamination of *Acanthamoeba* in contact lens care system. **Korean Journal Ophthalmology**, Ulsan, v. 38, n. 5, p. 756-161, 1997
- LIESEGANG, J. Contact lens-related microbial keratitis: Part 1: Epidemiology, **The Journal of Cornea and External Diseases**, Jacksonville, v. 16, n. 2, p. 125-132, 1997
- LIMBERG, M. B. A review of bacterial keratitis and conjunctivitis. **American Journal of Ophthalmology**, Liverpool, v. 112, n. 4, p. 2-9, 1991.
- MACFADDIN, J. F. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3^a ed. Philadelphia: **Lippincott William & Wilkins**; 2000, 912p.
- MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. **Clinical Microbiology Reviews**, Richmond, v. 16, n. 2, p. 273-307, 2003.
- MARSHALL, K. C. Adsorption and adhesion process in microbial growth at interfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, New South Wales, v. 1, p. 59-86, 1986.
- MARTINEZ, A. J.; VISVESVARA, G. S. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. **Brain Pathology**, Pittsburgh, v. 7, n. 1, p. 583-598, 1997.
- MATHERS, W.; SCOTT, N. E.; LANE, J. L.; WILSON, M.; ALLEN, R. C.; FOLBERG, R. Confirmation of Confocal Microscopy Diagnosis of *Acanthamoeba* Keratitis Using Polymerase Chain Reaction Analysis. **Archives of Ophthalmology**, Chicago, v. 118, n. 2, p. 178-183, 2000.
- McMILLAN, A. Laboratory diagnostic Methods and Cryopreservation of Trichomonas. In: HONIGBERG, B. M. Trichomonads Parasitic in Humans. New York: Springer-Verlag, 1989, p 110
- MUÑOZ, M. L.; CALDERÓN, J.; ROJKIND, M. The collagenase of *Entamoeba histolytica*. **Journal of Experimental Medicine**, Mexico, v. 155, n. 1, p. 42-51, 1982.
- MENEGHETTI, B. H.; SALLA, A. Bacterial and fungi infections epidemiology diagnosed by blood culture in Hospital Universitário de Santa Maria. **RBAC**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 173-175, 2004.
- NAGINGTON, J.; WATSON, P. G.; PLAYFAIR, T. J.; MCGILL, J.; JONES, B. R.; STEELE, A. D. Amoebic infections of the eye. **Lancet**, New York, v. 28, n. 2, p. 1537-1540, 1974.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests - Approved standard M2-A5. 5^a ed. Villanova: **National Committee for Clinical Laboratory Standards**; 1993.

NIEDERKORN, J. Y.; ALIZADEH, H.; LEHER, H.; MCCULLEY, J. P. The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. **Microbes and Infection**, Dallas, v. 1, n. 6, p. 437-443, 1999.

NEFF, R. J.; NEFF, R. H. The biochemistry of amoebic encystment. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 23, p. 51–81, 1969.

NEUBAUER, H.; MEYER, H.; FINKE, E. J. Human glanders. **International Review of Armed Forces Medical Services**. v. 70, n. 1, p. 258–265, 1997.

NILSSON, S. E.; MONTAN, P. G. The annualized incidence of contact lens induced keratitis in Sweden and its relation to lens type and wear schedule: results of a 3-month prospective study. **Contact Lens Association of Ophthalmologists**, Linköping, v. 20, n. 4, p. 225-230, 1994.

NOSÉ, W.; SATO, E. H.; FREITAS, D. Úlcera de córnea por *Acanthamoeba*: quatro primeiros casos no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, Rio de Janeiro, 51: 223 – 226, 1988.

ODOM, A., DEL POETA, M., PERFECT, J., HEITMAN, J. The immunosuppressant FK506 and its nonimmunosuppressive analog L-685,818 are toxic to *Cryptococcus neoformans* by inhibition of a common target protein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Durham, v. 41, n. 1, p. 156–161, 1997.

ORMEROD, L. D., PATON, B. G., HAAF, J.; TOPPING, T. M.; BAKER, A. S. Anaerobic bacterial endophthalmitis in rabbit. **Association For Research In Vision And Ophthalmology**, Boston, v. 94, n. 7, p. 799-808, 1987.

PAGE, F. C. A new Key to Fresh Water and Soil Gymnamoebae. Ambleside: **Fresh Water Biological Association**, 1988. 122p.

PALUMBI, S. R. Humans as the world's greatest evolutionary force. **Science**, Washington, v. 293, n. 5536, p. 1786–1790, 2001.

PETTIT, D.A., WILLIAMSON, J., CABRAL, G.A., MARCIANO-CABRAL, F. In vitro destruction of nerve cell cultures by *Acanthamoeba* spp.: a transmission and scanning electron microscopy study. **The Journal of Parasitology**, Richmond, v. 82, n. 5, p 769–777, 1996.

POGGIO, E. C.; GLYNN, R. J.; SCHEIN, O. D.; SEDDON, J. M.; SHANNON, M. J.; SCARDINO, V. A.; KENYON, K. R. The incidence of ulcerative keratitis among users of daily-wear and extended-wear soft contact lenses. **Journal Medical**, New England, v. 321, n. 12, p. 779–783, 1989

- POSENAUER, B.; FUNK, J. Chronic postoperative endophthalmitis caused by *Propionibacterium acnes*. **European Journal of Ophthalmology**, Freiburg, v. 2, n. 2, p. 94–97, 1992.
- PUSSARD, M.; PONS, R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). **Protistologica**, Dijon, v. 13, n. 4, 557-598, 1977.
- RICKARD, A. H.; STEPHEN, A. L.; HALL, L. S.; BUSWELL, C. M.; HIGH, N. J.; HANDLEY, P. S. Phylogenetic Relationships and Coaggregation Ability of Freshwater Biofilm Bacteria. Wiltshire, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 3644–3650, 2002.
- RICHARD, A. H., GILBERT, N.J., KOLENBRANDER, P.E., HANDLEY, P. S. Coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilmes. **Trends Microbiology**, Manchester, v. 11, n. 2, p. 94-100, 2003.
- RADFORD, C. F.; MINASSIAN, D. C.; DART, J. K. G. *Acanthamoeba* Keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. **British Journal of Ophthalmology**, London, v. 86, n. 5, p. 536–542, 2002.
- RONNER, A. B.; WONG, A. C. L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of food Protection**, Beltsville v. 56, n. 9, p.750-758, 1993.
- SALAH, M.; ICIAR, M. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, Brasilia, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.
- SALVANET-BOUCCARA, A.; SERRHINI, A.; FORESTIER, F.; DUBLANCHET, A. Endophthalmie chronique a` *Corynebacterium*. **Journal Français d'ophtalmologie**, Villeneuve-Saint-Georges, v. 15, n. 6, p. 378–383, 1992.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2^a ed. New York: **Cold Spring Harbour Laboratory Press**; 1989.
- SCHIRMBECK, T.; ROMÃO, E.; RODRIGUES, M. L. V.; FIGUEIREDO, J. F. C. Endoftalmite: análise de 58 casos. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, São Paulo, v. 63, n. 1, p. 39–44, 2000.
- SCHUSTER, F. L. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. **Clinical microbiology Reviews**, Washington, v. 15, n. 3, p. 342-354, 2002.

SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 126, p. 91-120, 2004a.

SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 34, p. 1001–1027, 2004b.

SEAL, D. V.; KIRKNESS, C. M.; BENNETT, H. G. B. Population-based cohort study of microbial keratitis in Scotland: incidence and features. **Contact Lens Anterior Eye**, Western Infirmary, v. 22, n. 2, p. 49 – 57, 1999.

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

SMOLIN, G; THOFT, R. A. 2^a ed. Massachusetts: **The cornea**; 1987. p. 204 - 214.

STEARNS, S. C.; EBERT, D. Evolution in health and disease. **Quarterly Review of Biology**, New Haven, v. 76, n. 4, p. 417–432, 2001.

STEIN, R; STEIN, H; RAO, G. Contact Lens Complications. In: KASTL, P. E. Contact Lenses. The Clao Guide to Basic Science and Clinical Practice. Iowa: **Kendall/Hunt**; 1995, 17p.

SWARBRICK, H. A.; NGUYEN, P.; NGUYEN, T.; PHAM, P. The ChromaGen contact lens system: colour vision test results and subjective responses. **Ophthalmic and Physiological Optics**, Sydney, v. 21, n. 3, p. 182-196, 2001.

SZÉNÁSI, Z.; ENDO, T.; YAGITA, K.; NAGY, E. Isolated, identification and increasing importance of “free-living” amoebae causing human disease. **Journal Medical Microbiological**, Szeged, v. 47, n. 1, p. 5-16, 1998.

TSVETKOVA, N.; SCHILD, M.; PANAIOTV, S.; KURDOVA-MINTCHEVA, R.; GOTTSTEIN, B.; VALONIK, J.; ASPOCK, H.; LUCAS, M. S.; MULLER, N. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. **Parasitology Research**, Berlin, v. 92, p. 405-413, 2004.

VIEIRA, L. A; LIMA, A. L. H; CUNHA, M; MASCARO, V. Conceitos básicos e clínicos de doenças externas e córnea. In: LIMA, A. L. H.; DANTAS, M. C.N.; ALVES. M. R. Doenças externas oculares e córnea. 1^a ed. Rio de Janeiro: **Cultura Médica**; 1999. p. 6-9.

WALOCHNIK, J.; OBWALLER, A.; ASPOCK, H. Correlations between morphological, molecular, biological and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. **Applied Environmental Microbiology**, Vienna, v. 66, n. 10, p. 4408–4413, 2000.

WANG, A. G.; WU, C. C.; LIU, J. H. Bacterial corneal ulcer: a multivariate study. **Ophthalmologica**, Taipei, v. 212, n. 2, p. 126-132, 1998.

WILHELMUS, K. R.; ROBINSON, N. M.; FONT, R. A.; HAMILL, M. B.; JONES, D. B. Fungal Keratitis in contact lens wearers. **Journal Ophthalmology**, Huston, v. 106, n. 6, p. 708–714, 1988.

WILSON, L. A.; SAWANT, A. D.; SIMMONS, R. B.; AHEAM, D. G. Microbial contamination of contact lens storage cases and solutions. **American Journal of Ophthalmology**, Atlanta, v. 110, n. 2, p. 193–198, 1990.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, Göteborg, v. 59, n. 7, p. 727-733, 1996.

YU, H. S.; CHOI, K. H.; KIM, H. K.; KONG, H. H.; CHUNG, D. I. Genetic analyses of *Acanthamoeba* isolates from contact lens storage cases of students in Seoul. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 39, n. 2, p. 161-170, 2001.

YU, H.S.; KONG, H. H.; KIM, S.Y.; HAHN, Y. H.; HAHN, T. W.; CHUNG, D. I. Laboratory investigation of *Acanthamoeba* lugdunensis from patients with keratitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Bath, v. 45, n. 12, p. 1418–1426, 2004.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: **Determinação da Presença de *Acanthamoeba* spp. em biofilme de lentes de contato**

Pesquisador Responsável: Marilise Brittes Rott

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

Telefones para contato: (51) 9321 7630 - (51) 33164111 (com Marilise ou Claiton)

Nome do voluntário: _____

Idade: _____ anos

Responsável legal: _____

O Sr. (ª) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “**Determinação da Presença de *Acanthamoeba* spp. em biofilme de lentes de contato**”, de responsabilidade do pesquisador Marilise Brittes Rott.

A pesquisa tem o objetivo de isolar os “germes” presentes no estojo da lente de contato e os procedimentos utilizados não atentam contra a saúde do participante. As informações serão utilizadas para que possamos compreender melhor a doença causada pelos “germes” do estojo da lente de contato.

A participação no projeto é voluntária. Os procedimentos não implicarão em nenhum tipo de custo ao participante que terá acesso as informações mediante o contato com o pesquisador responsável.

Os benefícios resultantes da participação no projeto serão relacionados à avaliação completa no estojo da lente de contato.

A participação no projeto envolverá:

- Responder 17 perguntas sobre o uso das lentes;
- Permitir que seja coletado o líquido que está dentro do estojo onde são guardadas as lentes de contato quando elas não estão sendo usadas.

O nome do colaborador não será publicado juntamente com os dados obtidos na pesquisa.

Eu, _____, declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Porto Alegre, _____ de _____ de _____.

Nome e assinatura do paciente ou seu responsável legal

ANEXO II

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

1. Nome: _____
2. Idade: _____
3. Sexo: Masculino Feminino
4. Endereço: _____

5. Contato. e-mail: _____ fone: _____
6. Profissão: _____
7. Tipo de lente: _____
8. A quanto tempo usa lente de contato: _____
9. Tempo que possui a mesma lente: _____
10. Tipo de uso: Ocasional Diário Prolongado
11. Motivos para usar a lente: Terapêutico Estético
12. A lente passa por revisões profissionais periódicas: Sim Não
13. Tipo de desinfetante e a marca utilizada: _____
14. Tipo de solução de manutenção e sua marca: _____
15. Cuidados ao manusear as lentes: _____
16. Sintomas clínicos: Esporádicos Inexistentes Frequentes
17. Tratamentos já realizados e medicamentos: _____

ANEXO III

Resultados dos antibiogramas com os bastonetes Gram negativos isolados de estojos de lentes de contato.

Isolados	AN	A	C	Cl	E	Er	G	R	T	V
<i>Burkholderia mallei</i>	R	S	S	S	I	S	S	I	S	I
<i>B. mallei</i>	I	R	R	S	I	R	S	I	S	R
<i>B. mallei</i>	S	S	S	S	I	R	S	I	R	I
<i>B. mallei</i>	S	S	I	S	R	S	I	S	S	R
<i>B. mallei</i>	S	I	I	S	R	R	I	S	I	R
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	I	S	S	I	R	R	I	S	S	R
<i>Capnocytophaga cynodegmi</i>	S	S	R	R	S	R	S	S	S	R
<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	R	R	I	I	I	R
<i>Gardnerella vaginalis</i>	S	R	R	S	S	R	I	R	S	R
<i>G. vaginalis</i>	S	R	R	S	S	R	I	R	S	R
<i>G. vaginalis</i>	R	R	R	S	R	S	I	S	I	I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	I	I	I	S	R
<i>P. aeruginosa</i>	S	S	S	I	I	I	S	S	I	S
<i>P. aeruginosa</i>	I	S	S	I	I	R	S	S	S	R
<i>P. aeruginosa</i>	S	S	R	I	S	S	S	I	I	S
<i>P. aeruginosa</i>	R	S	R	I	R	R	R	R	R	R
<i>P. aeruginosa</i>	S	S	S	S	I	R	S	S	I	R
<i>P. aeruginosa</i>	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S
<i>P. aeruginosa</i>	R	I	R	S	R	R	R	R	R	R
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	S	S	S	S	S	R	S	S	I	R
<i>P. alcaligenes</i>	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R
<i>Xanthomonas campestris</i>	S	S	R	R	S	R	S	S	S	R
<i>X. campestris</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
<i>X. campestris</i>	R	S	R	S	R	S	S	I	S	R
<i>X. campestris</i>	S	S	R	S	S	S	S	I	S	R
<i>X. campestris</i>	R	S	R	S	S	S	S	I	I	R
<i>X. campestris</i>	S	S	R	R	S	R	S	S	S	R
<i>X. campestris</i>	S	S	R	R	I	R	S	S	S	R
<i>X. campestris</i>	S	S	R	S	S	R	S	I	S	S
<i>Xanthomonas fragariae</i>	I	S	S	S	S	R	S	S	S	R
<i>X. fragariae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S

AN- Ácido Nalidixico; A- Amoxicilina; C- Cefalotina; Cl- Cloranfenicol;

E- Estreptomicina; Er- Eritromicina; G- Gentamicina; R- Rifampicina;

T- Tetraciclina e V- Vancomicina.

S – Sensível; I – Intermediário e R – Resistente.

ANEXO IV

Resultados dos antibiogramas com os bastonetes Gram positivos isolados de estojos de lentes de contato

Isolados	AN	A	C	Cl	E	Er	G	R	T	V
<i>Arcanobacter pyogenes</i>	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S
<i>Bacillus cereus</i>	S	R	R	S	S	S	S	I	I	S
<i>B. cereus</i>	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S
<i>B. circulans</i>	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S
<i>B. circulans</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I
<i>B. circulans</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>B. circulans</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
<i>B. circulans</i>	I	R	S	S	S	S	S	I	S	S
<i>Bacillus pulmilus</i>	S	S	S	S	I	I	S	I	S	I
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	R	I	S	S	S	S	S	R	S	S
<i>Kurthia gibsonii</i>	R	S	S	I	S	S	I	S	S	S
<i>K. gibsonii</i>	S	S	S	S	I	S	S	I	R	S
<i>Kurthia sibirica</i>	S	S	S	S	S	R	S	S	I	I
<i>Kurthia zopfii</i>	S	S	I	S	S	R	S	S	S	R
<i>Streptobacillus moniliformes</i>	R	S	R	S	R	S	S	I	S	R
<i>Streptomyces sp.</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
<i>Turicella otitidis</i>	S	S	S	S	I	R	S	I	I	R

AN- Ácido Nalidixico; A- Amoxicilina; C- Cefalotina; Cl- Cloranfenicol;
E- Estreptomicina; Er- Eritromicina; G- Gentamicina; R- Rifampicina;
T- Tetraciclina e V- Vancomicina ;

S – Sensível; I – Intermediário e R – Resistente.

ANEXO V

Resultados dos antibiogramas de cocos Gram positivos isolados de estojos de lentes de contato

Isolados	AN	A	C	Cl	E	Er	G	R	T	V
<i>Alloiococcus otitidis</i>	R	S	S	S	S	I	S	I	S	R
<i>Deinococcus radiophilus</i>	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S
<i>D. radiophilus</i>	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
<i>Enterococcus faecium</i>	R	S	S	S	I	S	S	S	I	S
<i>E. faecium</i>	S	S	S	S	I	S	S	S	I	S
<i>Micrococcus lylae</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	R	S	S	I	S	S	S	I	S	S
<i>S. aureus</i>	R	S	I	S	S	S	S	S	I	S
<i>S. aureus</i>	R	S	I	I	R	I	S	R	S	S
<i>S. aureus</i>	S	S	I	S	S	S	S	S	R	I
<i>S. aureus</i>	R	S	I	S	S	S	S	R	I	S
<i>S. aureus</i>	R	S	R	R	I	R	S	R	S	R
<i>S. aureus</i>	S	S	S	S	I	R	I	S	S	S
<i>S. aureus</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>S. aureus</i>	R	S	S	I	S	R	S	S	S	S
<i>S. aureus</i>	R	S	I	I	S	R	I	S	S	I
<i>S. aureus</i>	I	S	I	I	S	I	S	S	I	S
<i>S. aureus</i>	I	S	S	S	R	R	S	S	S	S
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R	S	I	S	S	R	S	I	S	I
<i>S. epidermidis</i>	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S
<i>S. epidermidis</i>	R	S	I	S	I	R	S	S	S	S
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	R	S	I	I	S	R	S	S	S	S
<i>S. haemolyticus</i>	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S
<i>Staphylococcus intermedius</i>	R	S	I	S	I	I	I	S	S	S
<i>S. intermedius</i>	R	S	S	I	S	R	S	S	S	S
<i>S. intermedius</i>	R	S	S	I	S	S	S	I	S	S
<i>Staphylococcus lentus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
<i>S. lentus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	R	S	I	I	I	R	S	I	S	I
<i>S. saprophyticus</i>	R	S	I	S	S	I	I	S	I	S

¹N- Ácido Nalidixico; A- Amoxicilina; C- Cefalotina; Cl- Cloranfenicol; E- Estreptomicina; Er- Eritromicina; G- Gentamicina; R- Rifampicina; T- Tetraciclina e V- Vancomicina ; S – Sensível; I – Intermediário e R – Resistente.

ANEXO VI

Resultados dos antibiogramas com Cocobastonetes Gram positivos isolados de estojos de lentes de contato.

Isolados	NA	A	C	Cl	E	Er	G	R	T	V
<i>Brevibacterium epidermidis</i>	R	S	S	S	R	I	S	I	S	R
<i>B. epidermidis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
<i>B. epidermidis</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
<i>Brevibacterium iodinum</i>	S	S	S	S	R	R	S	I	S	R
<i>Brevibacterium casei</i>	S	S	R	S	S	R	S	I	S	R
<i>B. casei</i>	S	S	S	S	S	R	I	I	I	R
<i>Brevibacterium linens</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
<i>B. linens</i>	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S
<i>Corynebacterium xerosis</i>	R	S	S	I	S	S	S	I	S	S
<i>C. xerosis</i>	R	S	I	S	S	S	S	I	I	S
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	S	S	S	S	R	R	I	S	R	S
<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i>	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S
<i>C. glucuronolyticum</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>C. glucuronolyticum</i>	R	S	S	S	I	S	S	I	S	S
<i>C. glucuronolyticum</i>	R	S	S	S	I	S	S	S	I	S
<i>C. glucuronolyticum</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	I
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	S	S	R	R	S	R	S	S	I	S
<i>Dermabacter hominis</i>	S	S	S	I	R	S	S	S	I	S
<i>D. hominis</i>	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R
<i>Jonesia denitrificans</i>	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S
<i>Kocuria rosea</i>	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<i>Listeria grayi</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
<i>L. grayi</i>	S	R	R	S	S	R	S	R	R	R
<i>Listeria innocua</i>	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S
<i>L. innocua</i>	S	S	R	S	S	R	S	R	I	S
<i>L. innocua</i>	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
<i>L. innocua</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
<i>L. innocua</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S
<i>L. innocua</i>	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S
<i>L. innocua</i>	S	S	S	S	I	S	S	R	S	R
<i>L. innocua</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
<i>Listeria seeligeri</i>	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
<i>L. seeligeri</i>	R	I	S	S	I	R	S	S	S	S

AN- Ácido Nalidixico; A- Amoxicilina; C- Cefalotina; Cl- Cloranfenicol;
 E- Estreptomicina; Er- Eritromicina; G- Gentamicina; R- Rifampicina;
 T- Tetraciclina e V- Vancomicina ;
 S – Sensível; I – Intermediário e R – Resistente.

Continuação: Resultados dos antibiogramas com Cocobastonetes Gram positivos isolados em estojos de lentes de contato.

Isolados	NA	A	C	Cl	E	Er	G	R	T	V
<i>Listeria welshimeri</i>	S	S	S	S	I	S	S	S	S	I
<i>Microbacterium arborexens</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>M. arborexens</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Microbacterium lacticum</i>	R	S	R	R	S	R	S	S	I	S
<i>Micrococcus luteus</i>	S	S	S	S	R	S	R	I	S	S
<i>Moraxela osloensis</i>	I	S	S	S	R	R	S	S	R	R
<i>Nesterenkonia halobia</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>N. halobia</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>N. halobia</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S

AN- Ácido Nalidixico; A- Amoxicilina; C- Cefalotina; Cl- Cloranfenicol;
 E- Estreptomicina; Er- Eritromicina; G- Gentamicina; R- Rifampicina;
 T- Tetraciclina e V- Vancomicina ;
 S – Sensível; I – Intermediário e R – Resistente.

ANEXO VII**Fixador de Shaudinn modificado (Bruckner, 1993)**

1. Solução de sulfato de cobre:

- Sulfato de cobre II $5H_2O$	20g
- Água destilada-deionizada	1000mL

2. Solução estoque

- Solução de sulfato de cobre II	600mL
- Álcool etílico a 95%	30mL
- Glicerina	15mL

3. Solução fixadora:

-Solução estoque	100mL
- Ácido acético glacial	5mL

Obs: adicionar o ácido acético imediatamente antes do uso.

Coloração de tricrômico de Wheatley modificada por Gomori (Bruckner, 1993).

Tricrômico:

- Cromotrope 2R	0,6g
- Light green SF	0,2g
- Ácido fosfotúngstico	0,7g
- Ácido acético gracial	1mL
- Água destilada	100mL

Procedimento.

Após fixadas as ,aminas foram tratadas como segue:

- Álcool 70% durante 5 min
- Álcool 70% iodado 1min
- Álcool 70% 5mim
- Álcool 70% 3 min
- Tricrômico 13 min
- Álcool 90% acidificado de 1 a 3 segundos
- Álcool 100% para limpar
- Álcool 100% em duas cubas 3 min cada

Meio Proteose Peptona Extrato de Levedo e Glicose (PYG) pH 6,5 ± 0,2.

- Polipeptona	7,5g
- Extrato de levedo	0,75g
- Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,98g
- Cloreto de cálcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0,098g
- Citrato de sódio (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O)	1g
- Sulfato ferroso amoniacal [Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6 H ₂ O]	0,02g
- Diidrogenofosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	0,034g
- Hidrogenofosfato dissódico anidro	0,355g
- Glicose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	15g
- Água destilada	1000mL

Preparação

Dissolver todos os componentes, com exceção do CaCl₂ em 900 mL de água destilada. Adicionar o CaCl₂ até a completa dissolução. Distribuir em vidro de Duran® e autoclavar (121°C/15min).