

Contribuição ao estudo da suscetibilidade de *Acanthamoeba* spp a diferentes métodos de desinfecção de lentes de contacto gelatinosas.

DENISE DE FREITAS¹; RUBENS BELFORT JUNIOR²; ANNETTE S. FORONDA³

INTRODUÇÃO

Amebas, ainda impropriamente chamadas de vida livre, são os protozoários mais recentemente descobertos como podendo ser causadores de doença fatal em humanos (MARTINEZ, 1985). Estas amebas eram consideradas exclusivamente de vida livre porque não necessitavam de hospedeiro para desenvolvimento e reprodução, como acontece com protozoários parasitas, patogênicos ou não (PAGE, 1967).

As fontes de infecção podem ser as mais diversas devido a ampla difusão destes protozoários na natureza. A. V. L. têm sido isoladas do solo e água, até no continente Antártico (BROWN e col., 1982), de lagos (WELLINGS e col., 1977) açudes (FORONDA, 1979), sedimento oceânico (SAWYER e col., 1977), piscinas (FORONDA e col., 1985), água mineral engarrafada no Brasil (SALAZAR e col., 1982); e no México (RIVERA e col., 1981), da mucosa nasal (SIMITZIS e col., 1979; DE JONCKHEERE & MICHEL, 1988) e cavidade oral de humanos (WANG & FELDMAN, 1967; FORONDA, 1979) e do ar (KINGSTON & WARHURST, 1969).

Desde que JONES e col. (1975b) apresentaram em reunião do Grupo de Imunologia e Microbiologia Ocular, em Dallas, 1973, o comprometimento ocular por protozoários do gênero *Acanthamoeba*, seguidos pela primeira referência na literatura mundial por NAGINGTON e col. (1974), relatos de diferentes partes do mundo têm sido regularmente publicados, com um aumento no número de casos, somando nos últimos anos mais de oitenta (Tabela 1).

Quando *Acanthamoeba* sp é agente causal de ceratite, esta se caracteriza por infiltrados que podem ser epiteliais, subepiteliais ou estromais, únicos e ou múltiplos, centrais ou paracentrais, de aspecto numular ou dendritiforme. Quando múltiplos, os infiltrados frequentemente coalescem e tomam a forma de anel, completo ou incompleto (AURAN e col., 1987). A ceratite geralmente apresenta progressão lenta, com episódios alternados de regressão e recrudescência, podendo estes estarem relacionados com as fases de encistamento e desencistamento do protozoário, bem como o aparecimento de defeito epitelial recorrente e severa dor (AURAN e col., 1987). O comprometimento corneano, em grande parte dos casos, é acompanhado de reação na câmara anterior, geralmente de média intensidade. Mas, algumas vezes, a reação pode ser severa, com presença de hipópio. Precipitados ceráticos, quando presentes, localizam-se difusamente na córnea ou atrás da lesão corneana (AURAN e col., 1987).

A história natural da doença é de úlcera severa que evolui com afinamento corneano, descemetocele e até eventual perfuração, endoftalmite e enucleação. Em alguns casos, a cirurgia é necessária para terapêutica e ou esclarecimento diagnóstico.

Embora testes de susceptibilidade "in vitro" tenham mostrado que várias espécies de trofozoitos são suscep-

tíveis a diversos agentes antimicrobianos, os cistos são altamente resistentes a maioria destes compostos (JONES, 1986).

Nenhuma droga ou combinação de drogas têm sido consistentemente testadas em um grande número de pacientes portadores de ceratite por *Acanthamoeba* e o tratamento clínico em muitos casos deve necessitar de um acompanhamento por longo período, talvez até por mais de um ano (STERN, 1988).

Vários métodos têm sido empregados para o diagnóstico de ceratite por *Acanthamoeba*. Entre estes, o raspado corneano é frequentemente realizado, e pode ser corado com Giemsa (NOSE e col., 1988), "calcofluor white" (WILHELMUS e col., 1986; DAVIS e col., 1987 e HOLLAND & DONZIS, 1987) ou ainda, se empregada a técnica da imunofluorescência indireta (EPSTEIN e col., 1986 e COHEN e col., 1987b).

O cultivo destas amebas pode ser realizado em ágar pouco ou não nutriente, acrescido ou não de bactérias vivas ou mortas (PAGE, 1967) ou, ainda, ser axênizado (CURSONS e col., 1980). FORONDA e col. (1974) introduziram entre nós os meios de ágar-infusão de feno e soja para o cultivo destes protozoários.

O estudo histológico, quer através de biópsia, quer de espécime corneano obtido após transplante de córnea, permite a identificação de cistos e trofozoitos, podendo-se utilizar corantes como o "calcofluor white" (MARINES e col., 1987) ou mesmo os rotineiros, como a hematossilina-eosina (NOSE e col., 1988). A espécie envolvida pode ser identificada em cortes histológicos corados com anticorpos imunofluorescentes, como foi descrito por KEY III e col. (1980), SCULLY e col. (1985), COHEN e col. (1985) e MOORE e col. (1985).

Ceratite por *Acanthamoeba* incide, predominantemente, em adultos jovens saudáveis, como acometimento ocular unilateral (Tabela 1). Previamente à infecção, pode haver o relato de trauma ocular nos mais variados graus ou exposição a água contaminada.

Fatores associados têm sido confirmados, dentre eles, emerge, desde 1984, o uso de lentes de contacto gelatinosas (L. C. G.) (MOORE e col., 1985; *ACANTHAMOEBA*, 1986; STEHR-GREEN e col., 1987; *ACANTHAMOEBA*, 1987; MOORE e col., 1987). WILHELMUS (1987) cita que o aumento progressivo de úlceras de córnea parece estar diretamente relacionado ao aumento de usuários de lentes de contacto. Em contraste, nos primeiros casos descritos na literatura predominava o antecedente de trauma, quer com vegetais ou pó, na história pregressa da moléstia (JONES e col., 1975b; NAGINGTON e col., 1974; LUND e col., 1978 e HAMBURG & DE JONCKHEERE, 1980) (Tabela 1).

Acanthamoeba contaminaram em maior proporção pacientes que não efetuavam a desinfecção de suas lentes de contacto na frequência recomendada pelo fornecedor

1 Mestre em Oftalmologia pela Disciplina de Oftalmologia da Escola Paulista de Medicina.

2 Prof. Adjunto da Disciplina de Oftalmologia da Escola Paulista de Medicina.

3 Prof: do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

TABELA 1 - CASOS DE CERATITE POR ACANTHAMOEBA DE ACORDO COM IDADE, SEXO, OLHO AFETADO, FATORES ASSOCIADOS, ESPÉCIE, AUTOR, ANO E PAÍS.

CASO	IDADE	SEXO	OLHO	FATORES ASSOCIADOS	ESPÉCIE	AUTOR E ANO	PAÍS
1	32	F	E	---	<u>Acanthamoeba</u> sp	Nagington e col.,1974	Inglaterra
2	59	M	D	Trauma com vegetal	<u>Acanthamoeba</u> sp	Nagington e col.,1974	Inglaterra
3	59	M	D	Trauma com vegetal	<u>A. polyphaga</u>	Jones e col.,1975b	E.U.A.
4	23	F	E	---	<u>A. polyphaga</u>	Jones e col.,1975b	E.U.A.
5	7	M	E	---	<u>Acanthamoeba</u> sp	Jones e col.,1975b	E.U.A.
6	58	M	D	Trauma com po'	<u>A. castellanii</u>	Jones e col.,1975a	E.U.A.
7	22	M	E	Trauma com po'	<u>A. castellanii</u>	Lund e col.,1978	Alemanha
8	27	M	E	---	<u>A. castellanii</u>	Key III e col.,1980	E.U.A.
9	36	M	D	Esporte aquático	<u>A. polyphaga</u>	Volker-Dieben e col.,1980	Holanda
10	67	M	D	Trauma com inseto	<u>Acanthamoeba</u> sp	Hamburg e col.,1980	Belgica
11	42	M	E	---	<u>A. castellanii</u>	Ma e col.,1981	E.U.A.
12	63	F	-	LCR	<u>Acanthamoeba</u> sp	Witschel e col.,1984	Alemanha
13	42	M	E	LCG,desinfecção química	<u>A. castellanii</u>	Samples e col.,1984	E.U.A.
14	48	F	D	LCG, trauma com água	<u>A. castellanii</u>	Hirst e col.,1984	E.U.A.
15	23	F	D	LCG	<u>Acanthamoeba</u> sp	Blackman e col., 1984	E.U.A.
16	44	M	D	Trauma com material orgânico	<u>A. polyphaga</u>	Wright e col.,1985	Inglaterra
17	29	F	AO	LCG	<u>A. castellanii</u>	Scully e col., 1985	E.U.A.
18	18	F	E	LCG, esporte aquático	<u>A. castellanii</u>	Cohen e col.,1985	E.U.A.
19	32	M	D	LCG	<u>A. polyphaga</u>	Cohen e col.,1985	E.U.A.
20	61	F	D	---	<u>A. castellanii</u>	Cohen e col.,1985	E.U.A.
21	56	F	D	Trauma com vegetal	<u>A. polyphaga</u>	Cohen e col.,1985	E.U.A.
22	13	F	D	LCG, desinfecção química, solução salina caseira	<u>A. castellanii</u>	Moore e col.,1985	E.U.A.
23	25	M	E	LCG, solução salina caseira	<u>A. castellanii</u>	Moore e col.,1985	E.U.A.
24	21	F	E	LCG, desinfecção química, solução salina caseira	<u>A. castellanii</u>	Moore e col.,1985	E.U.A.
25	28	F	D	Trauma com produto químico	<u>Acanthamoeba</u> sp	Theodore e col.,1985	E.U.A.
26	20	M	E	Trauma com serragem de planta	<u>A. castellanii</u>	Theodore e col.,1985	E.U.A.
27	45	M	D	Esporte aquático	<u>A. castellanii</u>	Theodore e col.,1985	E.U.A.
28	31	M	D	Trauma com produto químico, lavou o olho com água corrente	<u>A. castellanii</u>	Roussel e col.,1985	Australia
29	39	F	E	LCR	<u>Acanthamoeba</u> sp	Mannis e col.,1986	E.U.A.
30	38	M	D	LCG	<u>Acanthamoeba</u> sp	Mannis e col.,1986	E.U.A.
31	30	F	D	LCG, solução salina caseira, sem desinfecção	<u>Acanthamoeba</u> sp	Moore e col.1986	E.U.A.
32	23	M	E	LCG, solução salina caseira, desinfecção térmica	<u>A. polyphaga</u>	Moore e col.,1986	E.U.A.
33	23	F	D	LCG, solução salina caseira	<u>Acanthamoeba</u> sp	Moore e col.,1986	E.U.A.
34	17	F	D	LCG, solução salina caseira	<u>A. castellanii</u>	Epstein e col.,1986	E.U.A.
35	35	F	E	LCG,desinfecção térmica, solução salina caseira	<u>Acanthamoeba</u> sp	Epstein e col.,1986	E.U.A.
36	25	M	E	LCG	<u>A. castellanii</u>	Wilhelms e col.,1986	E.U.A.
37	45	M	-	LCG	<u>A. polyphaga</u>	Wilhelms e col.,1986	E.U.A.
38	40	M	-	Trauma corneano	<u>A. rhysodes</u>	Wilhelms e col.,1986	E.U.A.
39	24	F	D	Gravidez	<u>Acanthamoeba</u> sp	Wilhelms e col.,1986	E.U.A.
40	17	M	E	LCG, esporte aquático	<u>A. castellanii</u>	Wilhelms e col.,1986	E.U.A.
41	23	F	E	LCG	<u>Acanthamoeba</u> sp	Margo e col.,1986	E.U.A.
42	31	M	E	---	<u>Acanthamoeba</u> sp	Yeoh e col.,1987	Inglaterra
43	53	M	D	---	<u>Acanthamoeba</u> sp	McClellan e col.,1987	Australia
44	50	M	E	LCG	<u>Acanthamoeba</u> sp	Croxatto e col., 1987	Argentina
45	55	F	---	LCG	<u>Acanthamoeba</u> sp	Croxatto e col., 1987	Argentina
46	34	F	D	LCG, solução salina caseira, desinfecção com peróxido de hidrogênio, trauma com po'	<u>A. polyphaga</u>	Cohen e col.,1987b	E.U.A.
47	33	M	D	LCG, solução salina caseira, desinfecção térmica	<u>Acanthamoeba</u> sp	Cohen e col.,1987b	E.U.A.
48	27	F	D	LCG, solução salina caseira, desinfecção térmica, esporte aquático	<u>A. hatchetti</u> e <u>A. polyphaga</u>	Cohen e col.,1987b	E.U.A.

CASO	IDADE	SEXO	OLHO	FATORES ASSOCIADOS	ESPECIE	AUTOR E ANO	PAIS
49	27	M	D	LCG, solução salina caseira, trauma com água, desinfecção térmica	<u>A. castellanii</u>	Cohen e col.,1987b	E.U.A.
50	24	M	D	LCG, esporte aquático	<u>Acanthamoeba</u> sp	Cohen e col.,1987b	E.U.A.
51	25	F	E	LCG, esporte aquático, desinfecção com peróxido de hidrogênio, solução salina caseira	<u>Acanthamoeba</u> sp	Cohen e col.,1987b	E.U.A.
52	66	M	E	LCG, solução salina caseira, desinfecção térmica	<u>Acanthamoeba</u> sp	Cohen e col.,1987b	E.U.A.
53	62	M	D	LCG, esporte aquático	<u>Acanthamoeba</u> sp	Mathers e col.,1987	E.U.A.
54	35	F	D	LCG	<u>Acanthamoeba</u> sp	Mathers e col.,1987	E.U.A.
55	24	F	E	LCG, solução salina caseira	<u>Acanthamoeba</u> sp	Dornic e col.,1987	E.U.A.
56	25	F	E	LCG, desinfecção com peróxido de hidrogênio	<u>Acanthamoeba</u> sp	Dornic e col.,1987	E.U.A.
57	31	M	E	LCR, uso de água corrente e saliva	<u>Acanthamoeba</u> sp	Koenig e col.,1987	E.U.A.
58	40	M	D	LCG, solução salina caseira, desinfecção térmica	<u>Acanthamoeba</u> sp	Holland e col.,1987	E.U.A.
59	41	F	D	---	<u>Acanthamoeba</u> sp	Margo, 1987	E.U.A.
60	38	M	E	LC Saturno pós transplante de córnea, desinfecção química	<u>Acanthamoeba</u> sp	Solomon e col.,1987	E.U.A.
61	28	F	D	LCG, desinfecção com peróxido de hidrogênio	<u>Acanthamoeba</u> sp	Davis e col.,1987	E.U.A.
62	27	M	E	Esporte aquático	<u>Acanthamoeba</u> sp	Davis e col.,1987	E.U.A.
63	23	F	E	LCG, uso de água corrente, desinfecção química	<u>Acanthamoeba</u> sp	Silvany e col.,1987a	E.U.A.
64	25	M	D	LCG, uso de água corrente, lavou o olho com água corrente	<u>Acanthamoeba</u> sp	Moore e col.,1987	E.U.A.
65	32	F	E	LCR e uso de água corrente	<u>Acanthamoeba</u> sp	Moore e col.,1987	E.U.A.
66	38	F	D	LCR	<u>Acanthamoeba</u> sp	Moore e col.,1987	E.U.A.
67	44	M	E	LCG, solução salina caseira, uso de água corrente	<u>A. culbertsoni</u>	Moore e col.,1987	E.U.A.
68	23	F	E	LCG, solução salina caseira, desinfecção térmica	<u>Acanthamoeba</u> sp	Moore e col.,1987	E.U.A.
69	31	F	D	LCG	<u>Acanthamoeba</u> sp	Moore e col.,1987	E.U.A.
70	40	F	E	LCG	<u>Acanthamoeba</u> sp	Moore e col.,1987	E.U.A.
71	31	F	E	LC Saturno, uso de água corrente, desinfecção com peróxido de hidrogênio, solução salina caseira	<u>Acanthamoeba</u> sp	Moore e col.,1987	E.U.A.
72	32	F	D	LCG	<u>Acanthamoeba</u> sp	Mosé e col.,1988	Brasil
73	38	F	D	LCG	<u>Acanthamoeba</u> sp	Mosé e col.,1988	Brasil
74	54	F	E	LCG, desinfecção química	<u>Acanthamoeba</u> sp	Mosé e col.,1988	Brasil
75	25	F	E	LCR, uso de água corrente	<u>Acanthamoeba</u> sp	Mosé e col.,1988	Brasil
76	26	M	E	LCG, solução salina caseira	<u>A. polyphaga</u>	Johns e col.,1988b	E.U.A.
77	42	M	E	LCG, solução salina caseira, desinfecção térmica	<u>A. polyphaga</u>	Lindquist e col.1988	E.U.A.
78	17	M	E	LCG, solução salina caseira, desinfecção térmica	<u>Acanthamoeba</u> sp	Lindquist e col.,1988	E.U.A.
79	21	M	E	LCG, solução salina caseira, desinfecção térmica	<u>Acanthamoeba</u> sp	Lindquist e col.,1988	E.U.A.
80	39	M	E	LCG, solução salina caseira, desinfecção térmica	<u>Acanthamoeba</u> sp	Lindquist e col.,1988	E.U.A.
81	30	M	D	LC Saturno, solução salina caseira, desinfecção térmica	<u>A. polyphaga</u>	Lindquist e col.,1988	E.U.A.
82	24	F	E	LCG, solução salina caseira	<u>A. culbertsoni</u>	Johns e col.,1988a	E.U.A.
83	22	M	E	LCG, solução salina caseira	<u>Acanthamoeba</u> sp	Johns e col.,1988a	E.U.A.

M - masculino, F - feminino, D - direito, E - esquerdo, AO - ambos os olhos.

Esporte aquático - prática com lente de contacto

LCG - lente de contacto gelatinosa

LCR - lente de contacto rígida

(---) - não referido

TABELA 2

Crescimento amebiano após exposição direta de *Acanthamoeba* spp a diferentes métodos de desinfecção de lentes de contacto gelatinosas.

Espécies avaliadas	A. polyphaga		A. castellanii		A. astronyxis		A. culbertsoni		Acanthamoeba sp	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Métodos										
Hidrocare	0	10	0	10	0	10	0	10	10	0
Flex-care	0	10	0	10	0	10	10	0	10	0
Asseptização Térmica	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
Controle	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0

e, também, naqueles que apresentavam desvios no período de uso e nos cuidados gerais com as lentes (**ACANTHAMOEBA**, 1987, STENSON, 1986).

É maior a associação existente entre soluções salinas caseiras utilizadas por pacientes que desenvolveram ceratite por *Acanthamoeba* em relação a controles são que utilizaram solução salina comercialmente fabricada (**ACANTHAMOEBA**, 1987).

Ainda, pacientes portadores de ceratite por *Acanthamoeba* usavam com maior frequência lente de contacto durante a natação em relação a controles normais (**ACANTHAMOEBA**, 1987).

Propriedades amebicidas e diferentes métodos de desinfecção e esterilização, sejam estes físicos ou químicos, têm sido amplamente pesquisados em todo o mundo em relação a lentes de contacto (LINDQUIST e col., 1987, LUDWIG e col., 1986, FREITAS e col., 1988), piscinas (DE JONCKHEERE, 1982), instrumentos cirúrgicos (MEISLER e col., 1985) e soluções oftálmicas (SILVANY e col., 1987b e 1988).

LINDQUIST e col. (1987) avaliando a susceptibilidade de *Acanthamoeba* a diferentes sistemas de esterilização de lentes de contacto hidroólicas, concluíram que a desinfecção térmica a 80°C erradica *Acanthamoeba*, entretanto, o mesmo não ocorre com peróxido de hidrogênio e com a desinfecção química à base de amônia quaternária. LUDWIG e col. (1986), em estudo semelhante, testaram o Flex-care (gluconato de clorexidina a 0.005%, timerosal a 0.001%), o Allergan Soft Contact Lens Disinfection Solution (cloreto de trietanol alkyl amonio a 0.013%, timerosal 0.002%) e o Lensept (peróxido de hidrogênio a 3%) e deduziram que a desinfecção térmica foi efetiva em erradicar as duas espécies de *Acanthamoeba* testadas, enquanto que, o Flex-care mostrou-se efetivo para *A. castellanii* mas não para *A. polyphaga*; quanto ao Allergan Soft Contact Lens Disinfection Solution demonstrou-se que a solução não tem qualquer ação na eliminação de *Acanthamoeba*, notando-se os mesmos resultados para o peróxido de hidrogênio a 3%. FREITAS e col. (1988) testaram a susceptibilidade da *Acanthamoeba culbertsoni* a Flex-care (timerosal 0.01%, edetato dissódico 0.1%, gluconato de clorexidina 0.005%), Hidrocare (cloreto de trietanol aquil amônio miramine 0.330 mg, timerosal sódico

co 0.023 mg) e a unidades de desinfecção térmica e concluíram que, desde que corretamente utilizados, parecem ser eficazes na eliminação do protozoário.

O presente estudo teve por objetivo testar a susceptibilidade das espécies mais frequentes como causadores de infecção ocular, de acordo com a literatura, (*A. astronyxis*, *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni* e *Acanthamoeba* sp) a um método de desinfecção térmica (aspetização térmica) e a dois métodos de desinfecção química (Hidrocare e Flex-care) de lentes de contacto gelatinosas.

Teve, ainda, o objetivo de sugerir método de desinfecção eficaz para erradicar amebas de lentes de contacto.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois diferentes experimentos para avaliar a susceptibilidade de cinco espécies de *Acanthamoeba* a três tipos de desinfecção de lentes de contacto gelatinosas (L.C.G.).

O Experimento I teve a finalidade de testar a susceptibilidade das diferentes espécies de amebas aos métodos de desinfecção de L. C. G. criando-se um modelo de contaminação que se aproximasse daquele possível de ser encontrado pelo usuário. Para tanto, L. C. G. foram contaminadas, desinfectadas e posteriormente cultivadas.

O Experimento II, com a mesma finalidade do Experimento I, testou as amebas diretamente aos métodos de esterilização propostos, sem a utilização de L.C.G.

Todo material utilizado nos experimentos foi previamente esterilizado em autoclave e o manuseio feito em capela de fluxo laminar contínuo, modelo vertical.

1. Espécies avaliadas:

Para a realização deste estudo, três espécies de *Acanthamoeba* (*A. astronyxis*, *A. polyphaga* e *A. castellanii*) foram adquiridas no "American Type Culture Collection — A.T.C.C.", E.U.A.; a *Acanthamoeba culbertsoni* foi cedida pelo Dr. E. Willaert, E.U.A. e a *Acanthamoeba* sp, também aqui utilizada, foi a primeira espécie patogênica ocular isolada de úlcera de córnea no Brasil.

TABELA 3

Crescimento amebiano em lentes de contacto gelatinosas contaminadas com *Acanthamoeba* spp após exposição aos diferentes métodos de desinfecção.

Espécies avaliadas	A. polyphaga		A. castellanii		A. astronyxis		A. culbertsoni		Acanthamoeba sp	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Métodos										
Hidrocare	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
Flex-care	0	10	0	10	0	10	8	2	8	2
Asseptização Térmica	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
Controle	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0

— *Acanthamoeba astronyxis*: A.T.C.C. número 30.901, obtida de lago, por F. C. Page, Wisconsin, 1964.

— *Acanthamoeba polyphaga*: A.T.C.C. número 30.873, isolada de úlcera de córnea humana, por G. Nagington, Inglaterra, 1974.

— *Acanthamoeba castellanii*: A.T.C.C. número 30.868, isolada de úlcera de córnea humana, por G. Nagington, Inglaterra, 1974.

— *Acanthamoeba culbertsoni*: obtida de E. Willaert, E. U.A.

— *Acanthamoeba* sp: sem identificação de espécie, isolada de úlcera de córnea humana, por A. S. Foronda, Brasil, 1987.

2. Obtenção e contagem do inóculo:

Os inóculos de *Acanthamoeba* a serem testados foram obtidos levando-se a superfície das culturas com água destilada esterilizada e a contagem dos protozoários feita em câmara de Fucks-Rosenthal, em microscopia óptica de contraste de fase, sob aumento linear de 400 vezes.

3. Sistemas de desinfecção:

3.1 Flex-care (Alcon Laboratórios do Brasil): solução aquosa isotônica tamponada, contendo cloreto de sódio, borato de sódio e ácido bórico, preservada em timerosal 0,001%, edetato dissódico 0,1% e gluconato de clorexidina 0,0005%, segundo especificações do fabricante.

3.2 Hidrocare (Allergan-Lok Produtos Farmacêuticos LTDA): solução onde cada mililitro contém cloreto de trietanol alquil amônio-miramine TA-30 (amônia quaternária) 0,330 mg/ml; timerosal sódico 0,023 mg/ml e veículo q.s.p 1 ml, segundo especificações do fabricante.

3.3 Asseptizadores térmicos Hydroset (Prolens Produtos Opticos LTDA): aparelhos elétricos especialmente fabricados para a desinfecção térmica de L.C.G.

Previamente ao início dos testes, oito asseptizadores novos foram submetidos a avaliação quanto ao tempo e temperatura alcançados durante um ciclo completo de funcionamento a 110 watts. As medidas de temperatura foram obtidas através da adaptação de termopares tipo cobre-constantan na face interna do porta-lentes de contacto preenchido com soro fisiológico. Os termopares eram ligados a um termômetro digital marca Omega, modelo 650, sendo as temperaturas obtidas a cada cinco minutos, do início ao final do ciclo. Os oito asseptizadores avaliados foram submetidos a análise de variância por postos de Kruskal-Wallis, sendo primeiro consideradas todas as medidas de tempo e temperatura obtidas durante um ciclo completo e em segundo, consideradas somente aquelas iguais ou superiores a 80°C. Os asseptizadores que apresentaram variação de temperatura estatisticamente significativa foram eliminados, e os cinco que alcançaram maior temperatura por um tempo mais prolongado foram os utilizados nos experimentos.

Todos os oito asseptizadores avaliados apresentaram capacidade de manter temperatura superior a 80°C por dez minutos. A análise da variância por postos de Kruskal-Wallis em relação a todas as medidas de tempo e temperatura obtidas mostrou que o asseptizador de número cinco era significativamente menor em relação ao asseptizador de número dois, sendo, portanto, eliminado do estudo. Ainda, quanto a análise das temperaturas iguais ou superiores a 30°C, nenhum dos aparelhos mostrou-se significativamente diferente. Portanto, foram escolhidos para a realização dos experimentos os aparelhos de número 1, 2, 4, 6 e 7, porque estes mantiveram uma melhor padronização e maiores temperaturas.

4. Cultivos:

Todos os cultivos foram realizados em placas de Petri, em meio sólido de ágar-infusão de soja, desenvolvido segundo metodologia de FORONDA e col. (1974), acrescidos de *Escherichia coli*.

Após a semeadura, as placas eram embaladas com Parafilm-M, de cinco centímetros de largura, para promover a vedação do cultivo.

As placas semeadas, devidamente identificadas, foram mantidas em estufa a 25°C.

5. Avaliação do crescimento amebiano:

Os exames para controle do crescimento amebiano foram realizados diariamente, até o vigésimo dia após a semeadura, sem abertura das placas, utilizando-se microscopia óptica, sob aumento linear de 100 vezes.

O crescimento amebiano foi considerado positivo quando os cistos semeados se desescentavam, dando origem às formas trofozoíticas. Quando isto não ocorria, concluiu-se pela inviabilidade dos cistos, sendo considerado o crescimento negativo, deduzindo-se pela eficácia do método de desinfecção testado contra a *Acanthamoeba* avaliada.

6. Experimento I:

Cada uma das cinco espécies de *Acanthamoeba* foi testada dez vezes para cada um dos três tipos de desinfecção em avaliação (150 testes), através da contaminação de L.C.G. com inóculo de cistos e trofozoitos, desinfecção e posterior cultivo.

6.1 Obtenção do inóculo:

Repiques seriados de cultivos foram realizados antes da data prevista para o início de cada teste e a cultura utilizada como fonte de trofozoitos foi de 48 horas e a de cistos de 15 dias.

6.2 Inóculos utilizados:

A. astronyxis: 3.8 x 10⁵ cistos e trofozoitos

A. polyphaga: 6.4 x 10⁵ cistos e trofozoitos

A. castellanii: 3.8 x 10⁵ cistos e trofozoitos

A. culbertsoni: 3.0 x 10⁶ cistos e trofozoitos

Acanthamoeba sp: 1.3 x 10⁶ cistos e trofozoitos

6.3 Contaminação das L.C.G.:

Foram utilizadas 50 L.C.G. novas, marca Soflens (Bausch & Lomb), com composição de 61.4% de Poli (2-hidroxietilmetacrilato) e 38.6% de água, imersas em solução estéril de cloreto de sódio a 0.9%.

Para cada espécie testada, 10 L.C.G. eram colocadas em uma placa de Petri com o inóculo correspondente. A placa era vedada com folhas de poliviril e incubada a 25°C por 16 horas. Cada espécie foi testada individualmente e com um intervalo de tempo de, no mínimo, uma semana para evitar o manuseio com múltiplas espécies em um mesmo dia.

Após o período de contaminação, as dez lentes foram cortadas em quatro partes, sendo uma delas semeada para controle e as outras três submetidas aos diferentes tipos de desinfecção, com posterior cultivo.

Logo após a retirada de todas as lentes da placa onde foram contaminadas, o inóculo foi homogeneizado, obtendo-se uma alíquota que foi examinada em seguida sob microscopia de contraste de fase, com aumento linear de 400 vezes, para a verificação da presença de cistos e trofozoitos de amebas.

6.4 Avaliação dos sistemas de desinfecção:

6.4.1 — Flex-care:

Cada um quarto das 10 lentes contaminadas foi colocado, separadamente, em frascos contendo 10 ml de Flex-care

e mantido imerso por um período de quatro horas. Em seguida as lentes foram retiradas com pinça e sementes, tendo-se a cautela de passar cada face da L.C.G. várias vezes no ágar e, em seguida, deixar uma das faces totalmente em contacto com o meio de cultivo. As soluções onde as lentes ficaram imersas foram homogeneizadas, com seu volume aspirado cuidadosamente na sua totalidade e centrifugado por oito minutos a 1500 rotações por minuto (r.p.m.), seguindo-se aspiração do sobrenadante e homogeneização do sedimento com posterior cultivo.

6.4.2 — Hidrocare:

Cada um quarto das dez lentes contaminadas foi colocada, separadamente, em frascos contendo 10 ml de Hidrocare e mantido imerso por um período de oito horas. O restante do procedimento foi realizado seguindo a mesma metodologia empregada para o Flex-care.

6.4.3 — Aseptização Térmica:

Cada um quarto das dez lentes contaminadas foi colocada separadamente, dentro de cada porta-lentes de contacto preenchido com soro fisiológico estéril. Seguindo-se todas as especificações do fabricante, deixou-se cumprir um ciclo completo de desinfecção, sendo então aberto o porta-lentes cuidadosamente, retirada a lente com pinça e realizada a sementeira. A solução fisiológica, onde a lente permaneceu imersa durante o ciclo foi homogeneizada, cuidadosamente aspirada na sua totalidade e semeada.

7. Experimento II:

Cada uma das cinco espécies de *Acanthamoeba* foi testada dez vezes para cada um dos três tipos de desinfecção em avaliação (150 testes), com exposição direta dos protozoários, sem a utilização de L.C.G.. Vencido o período de desinfecção os protozoários foram submetidos à lavagem e posterior cultivo.

7.1 Obtenção do inóculo:

As placas, onde foram semeados os controles de *Acanthamoeba* spp do Experimento I, tiveram suas superfícies lavadas até a obtenção de inóculo de 40 ml.

A cidade dos cultivos era, em média, de duas semanas.

7.2 Inóculos utilizados:

A. astronyxis: 3.3 x 10⁶ cistos e trofozoitos

A. polyphaga: 6.0 x 10⁶ cistos e trofozoitos

A. castellanii: 3.3 x 10⁶ cistos e trofozoitos

A. culbertsoni: 2.2 x 10⁶ cistos e trofozoitos

Acanthamoeba sp: 1.3 x 10⁶ cistos e trofozoitos

7.3 Avaliação dos sistemas de desinfecção:

Utilizaram-se as mesmas soluções desinfetantes (Flex-care e Hidrocare) e os mesmos cinco assepsizadores térmicos (Hydroset) do Experimento I.

Cada inóculo de 40 ml das diferentes espécies foi homogeneizado e dividido em quatro volumes iguais de 10 ml destinados para a avaliação do Flex-care, Hidrocare e assepsização térmica, sendo, ainda, o último volume de 10 ml utilizado para controle.

Cada 1 ml do volume de 10 ml foi colocado em frascos, separadamente, contendo 10 ml de Flex-care e mantido assim por 4 horas, realizando-se o mesmo procedimento para o Hidrocare, mantido assim por 8 horas. Para a assepsização térmica, cada 1 ml foi colocado nos porta lentes de contacto, separadamente, e submetidos a um ciclo completo de assepsização a 110 watts.

O controle deste experimento foi realizado de maneira a colocar cada 1 ml dos 10 ml restantes do inóculo em frascos, separadamente, contendo 10 ml de água destilada estéril e mantidos em repouso.

Vencido o período de desinfecção química, as soluções foram homogeneizadas, com seus volumes cuidadosa e to-

talmente aspirados e centrifugados por oito minutos a 1500 r.p.m.. Os sobrenadantes foram aspirados e os resíduos homogeneizados com água destilada estéril e novamente submetidos a centrifugação por oito minutos a 1500 r.p.m., sendo este procedimento repetido por mais uma vez, totalizando 3 lavagens dos protozoários, até que os resíduos foram homogeneizados com um mililitro de água destilada estéril e em seguida semeados.

Quanto à desinfecção térmica, cessado o ciclo de assepsização, os porta-lentes eram cuidadosamente abertos e a suspensão homogeneizada, aspirada na sua totalidade e cultivada.

Ao fim dos testes, os controles, até então, estocadas, eram submetidos à mesma metodologia empregada para a desinfecção química e posteriormente semeados.

RESULTADOS

1. Experimento I:

1.1 As cinco alíquotas obtidas das soluções onde as L.C.G. permaneceram para contaminação foram positivas para a presença de cistos e trofozoitos de *Acanthamoeba* spp.

1.2 Todos os dez controles de cada uma das cinco espécies em avaliação apresentaram crescimento amebiano positivo.

1.3 Não houve crescimento amebiano de nenhum dos cento e cinquenta cultivos dos resíduos das soluções onde as L.C.G. ficaram imersas durante os processos de desinfecção.

1.4 A. astronyxis: em três dos testes realizados com Hidrocare, quatro com Flex-care e três com assepsização térmica foi observada a presença de formas císticas. Em nenhum dos trinta testes realizados foi observado crescimento amebiano.

1.5 A. polyphaga: em todos os trinta testes realizados foi observada a presença de formas císticas. Em nenhum dos trinta testes houve crescimento amebiano.

1.6 A. castellanii: em todos os trinta testes realizados foi observada a presença de formas císticas. Em um, dos dez testes realizados com o Flex-care (10%), observou-se crescimento amebiano. Em nenhum dos testes realizados com o Hidrocare houve crescimento amebiano.

1.7 A. culbertsoni: em todos os trinta testes realizados foi observada a presença de formas císticas. Em oito, dos dez testes realizados com o Flex-care (80%), foi observado crescimento amebiano. Em nenhum dos dez testes realizados com Hidrocare houve crescimento amebiano.

1.8 Acanthamoeba sp: em todos os trinta testes realizados foi observada a presença de formas císticas. Em oito, dos dez testes realizados com Flex-care (80%), foi observado crescimento amebiano. Em nenhum dos dez testes realizados com o Hidrocare houve crescimento amebiano.

2. Experimento II:

2.1 Todos os dez controles de cada uma das cinco espécies em avaliação apresentaram crescimento amebiano positivo.

2.6 A. astronyxis: em todos os trinta testes realizados foi observada a presença de formas císticas. Em nenhum dos trinta testes houve crescimento amebiano.

2.2 A. polyphaga: em todos os trinta testes realizados foi observada a presença de formas císticas. Em nenhum dos trinta testes houve crescimento amebiano.

2.5 A. castellanii: em todos os trinta testes realizados foi observada a presença de formas císticas. Em nenhum dos trinta testes houve crescimento amebiano.

2.4 A. culbertsoni: em todos os trinta testes realizados foi observada a presença de formas císticas. Em todos os dez testes realizados com o Flex-care (100%) foi observado

crescimento amebiano. Em nenhum dos dez testes realizados com o Hidrocare foi observado crescimento amebiano.

2.3 Acanthamoeba sp: em todos os trinta testes realizados foi observada a presença de formas císticas. Em oito dos dez testes realizados com o Hidrocare (80%) foi observado crescimento amebiano. Em todos os dez testes realizados com o Flex-care (100%) foi observado crescimento amebiano.

DISCUSSÃO

Nos E.U.A., onde lentes de contacto e seus acessórios são rigidamente controlados pela "Food and Drug Administration — F.D.A.", são exigidos níveis apenas de desinfecção para os diferentes sistemas de manutenção de L.C.G. pois, estudos realizados pelo órgão, têm provado que apenas a desinfecção já promove adequada segurança aos olhos dos usuários, não sendo necessário promover a esterilização (SIBLEY, 1981). As determinações canadenses adotadas pelo "Canadian Food and Drug Directorate" são semelhantes (FICHMAN, 1975).

Os sistemas de desinfecção para L.C.G. nos E.U.A. são avaliados de acordo com testes descritos no "Microbiological Guidelines" desenvolvido pelo "Office of Medical Devices of the F.D.A." (HOULSBY e col., 1984).

Basicamente, três testes podem ser utilizados para a avaliação: 1. Testes de Contribuição de Elementos, onde é analisada a quantidade de microrganismos eliminados de uma lente de contacto contaminada, durante cada passo de um procedimento de desinfecção completo;

2. Estudo da Contribuição Isolada do Agente Desinfetante Ativo, através do teste de porcentagem de morte ("D-value test");

3. Teste de Avaliação Microbiológica por Multi-itens, onde o processo completo de desinfecção é avaliado como um todo (limpeza, enxague e desinfecção propriamente dita).

HOULSBY e col. (1984) chamam a atenção de que muitas variáveis são envolvidas durante a limpeza e enxague de L.C.G., como por exemplo: manipulação das lentes, tempo empregado para cada procedimento, pressão aplicada sobre a lente durante a limpeza e volume utilizado para enxague. Acreditando que estes fatores possam alterar um teste em relação a outro, dentro de um experimento com vários testes, os autores sugerem que "cada parte de um sistema completo de desinfecção seja avaliada por sua individual contribuição em destruir ou remover microrganismos".

A maior parte dos estudos publicados na literatura mundial quanto a sistemas de desinfecção de L.C.G. e *Acanthamoeba*, tem se utilizado da avaliação por contribuição isolada do agente desinfetante ativo (LUDWIG e col., 1986, LINDQUIST e col., 1987, SILVANY e col., 1987b), exceto FREITAS e col. (1988) que além deste, aplicaram também o teste de avaliação microbiológica por multi-itens contra *Acanthamoeba culbertsoni* e dois sistemas de desinfecção.

No presente estudo, utilizou-se a avaliação por contribuição isolada do agente desinfetante ativo pois, devido ao conhecimento de serem os microrganismos em teste ubíquos na natureza, poderiam estar presentes nas soluções de enxague e assepsia do usuário (MOORE e col., 1987) funcionando como um meio de contaminação, restando somente a desinfecção propriamente dita como única alternativa de eliminação do protozoário. Além disso, por se tratarem de microrganismos dotados de capacidade de encistamento, nos pareceu mais interessante avaliar sua resistência aos diferentes químicos e a alta temperatura, do que a simples remoção mecânica por limpeza e enxague.

Existem dois métodos disponíveis para desinfecção de lentes de contacto gelatinosas: térmico e químico. Dentre estes, os mais corriqueiramente utilizados, e por este motivo

escolhidos para serem analisados neste estudo, são os aparelhos elétricos de desinfecção térmica, denominados assepsizadores e as soluções químicas Hidrocare e Flex-care.

O sistema térmico é o mais antigo método de desinfecção empregado para L.C.G., sendo sugerido em 1966 (PHILLIPS, 1977), reconhecido pelo "F.D.A." em 1972 e o único aprovado por esta entidade até 1977 (WECHSLER & GEORGE, 1981).

O "F.D.A. Guidelines for Premarked Approval of Contact Lenses and Related Accessories", em 1980, determinou que todos os aparelhos empregados para a desinfecção térmica de L.C.G. devem alcançar uma temperatura de, no mínimo, 80°C e mantê-la por um período de dez minutos durante um ciclo completo de assepsia (SIBLEY, 1981).

O risco de infecção oriunda de falha do sistema térmico de desinfecção de L.C.G. existe por várias razões. McBRIDE (1979) discute que nem sempre a temperatura obtida é suficiente para destruir determinados microrganismos, e quando o é, pode causar danos na composição da lente. WECHSLER & GEORGE (1981) e PHILLIPS (1977) acreditam que contaminação durante a desinfecção térmica pode ocorrer, mesmo após a realização de um ciclo completo de assepsia, através da sucção de microrganismos do meio ambiente para dentro do porta lentes de contacto, no espaço de tempo do resfriamento do ciclo. ERIKSEN (1978) refere que para se manter esterilização após um ciclo térmico completo deve haver vedação perfeita do conteúdo interno. Observa, através de estudos realizados em laboratório, que bactérias colocadas dentro do porta-lentes de contacto e submetidas a assepsia térmica são destruídas, mas o conteúdo não se apresenta estéril. Menciona que bactérias povoadoras da área onde ocorreu o processo de resfriamento contaminam o interior do porta lentes. Acrescenta que esta contaminação poderia ser eliminada se o resfriamento fosse efetuado em um recipiente estéril.

Todos os testes do presente estudo foram realizados em capela de fluxo laminar vertical contínuo, promovendo a esterilização do meio ambiente. Este procedimento não permitiu que houvesse contaminação dos porta-lentes após a assepsia térmica, durante o período de resfriamento, como cita ERIKSEN (1978), WECHSLER & GEORGE (1981) e PHILLIPS (1977) pois todos os resultados obtidos foram negativos para crescimento amebiano, não havendo nenhum que pudesse ser questionado como falso positivo nas várias assepsias térmicas realizadas.

Em relação a A. V. L., DUMA (1972) avaliou a resistência destes parasitos à altas temperaturas e referiu que alguns trofozoítos podem tolerar temperaturas altas como 50°C por duas horas seguido de morte imediata a 57°C, tendo algumas cepas requerido 70°C para serem eliminadas.

A desinfecção térmica é um eficiente método na eliminação de *Acanthamoeba*.

LUDWIG e col. (1986) avaliaram três tipos diferentes de assepsizadores térmicos contra *Acanthamoeba castellanii* e *Acanthamoeba polyphaga*, cepas patogênicas oculares. Os protozoários foram suspensos em solução salina preservada à base de borato de sódio, ácido bórico, timerosal 0.001% e EDTA 0.1% e colocados dentro dos porta-lentes de contacto e, então, submetidos a um ciclo completo de assepsização. Não houve crescimento amebiano para nenhum dos três aparelhos avaliados em relação às duas espécies testadas, estando estes resultados concordantes com os por nós encontrados, só que, em nosso estudo, a suspensão dos protozoários foi realizada com água destilada pois, soluções preservadas podem atingir as amebas, como demonstrou SILVANY e col. (1987b e 1988) podendo criar dúvidas se a efetividade seria somente devida ao método térmico de desinfecção ou se o preservativo estaria influenciando nos resultados. Mesmo estando os controles positivos, que também foram suspensos nas mesmas soluções preservadas,

como descreveram LUDWIG e col. (1986), dúvidas poderiam ocorrer, pois HAMILTON (1971) relatou a potencialização de certos desinfetantes e preservativos frente a altas temperaturas.

LINDQUIST e col. (1987) submeteram quatro lentes de contacto de pacientes com úlcera de córnea por *Acanthamoeba* a diferentes métodos de desinfecção e concluíram que a desinfecção térmica a 80°C erradica o protozoário. É importante referir que os controlos foram positivos, demonstrando que as lentes estavam realmente contaminadas. Em um segundo tempo, os autores contaminaram lentes de contacto estéreis com os protozoários e as submeteram aos mesmos métodos de desinfecção do primeiro, e novamente a desinfecção térmica se mostrou efetiva. Não é relatada a metodologia empregada e as espécies testadas, sendo estes itens importantes, a nosso ver, devido o grande número de espécies e cepas envolvidas na etiologia da ceratite e porque entre estas existem resistências individuais (DUMA, 1972) que as diferenciam uma das outras, tornando-se importante a avaliação de um maior número possível de espécies, principalmente aquelas isoladas de úlceras corneanas (comprovadamente patogênicas oculares) ou de um centro de tipagem, como foi realizado em nosso estudo. FREITAS e col. (1988) testaram *A. culbertsoni* quanto à sensibilidade a métodos de desinfecção de L.C.G., e esta espécie, segundo a literatura, ainda não havia sido avaliada. Apesar de os autores terem empregado em alguns testes metodologia de desinfecção diferente em relação ao nosso estudo, comprovaram que a desinfecção térmica foi eficiente em eliminar o protozoário.

No presente estudo demonstrou-se que a desinfecção térmica, tanto no Experimento I como no II, é 100% efetiva na eliminação de *Acanthamoeba* spp, fato esse traduzido pela presença, em todos os testes, de cistos que não desenvolveram a forma trofozoítica, estando portanto, inviáveis.

Assepsia térmica era o único método de desinfecção reconhecido pelo "F.D.A." até 1979, quando o sistema químico foi aprovado (WECHSLER & GEORGE, 1981).

Alguns dos produtos utilizados na assepsia de L.C.G. apresentam suplementos sinérgicos como o edetato dissódico, ácido bórico, borato de sódio, estes presentes no Flex-care empregado em nosso estudo, e o ácido sórbico (JOSEPHSON & CAFFERY, 1981). O Hidrocare não apresenta na sua composição suplementos sinérgicos. É interessante referir que os nossos resultados demonstraram que o Flex-care, apesar de possuir suplementos sinérgicos na sua composição, parece ser menos efetivo em relação ao Hidrocare, que não os possui, podendo este fato nos levar a concluir que estes suplementos sinérgicos, em relação a A.V.L., não teriam importante efeito. NORTON e col. (1974) discutiram que o período de desinfecção normalmente realizado por usuários de L. C. G. é de uma noite, mas referiram que nem sempre isso ocorre, sendo necessário que estas soluções tenham ação em muito menos tempo. Propuseram que o tempo máximo necessário para desinfecção química de L.C. G. seja de quatro horas.

No presente estudo, empregamos quatro horas para o Flex-care e oito para o Hidrocare, pois optamos em seguir a orientação fornecida pelo fabricante através da bula, que, ao nosso ver, se aproximaria mais do que é realizado pelo usuário no seu dia a dia de cuidado da lente.

É importante lembrar que, pensando especialmente em cultivo de *Acanthamoeba*, estes protozoários, devido ao seu tamanho e peso, tendem a se depositar no fundo dos recipientes onde estão estocados em solução, não fazendo sentido a retirada de alíquotas, talvez, até da superfície, onde, provavelmente, não há o parasito, sem antes haver homogeneização com cuidadosa aspiração na totalidade do volume, como foi realizado em nossos experimentos com as soluções estudadas. A falta deste cuidado poderia acarretar em

um resultado falso-negativo, uma vez que o protozoário poderia permanecer na junção das paredes do frasco ou no fundo do recipiente onde estas soluções permaneceram em repouso.

Em relação aos sistemas químicos de desinfecção de L.C.G. e *Acanthamoeba*, LUDWIG e col. (1986) realizaram o primeiro estudo expondo *A. castellanii* e *A. polyphaga* ao Flex-care (gluconato de clorexidina 0.005% + timerosal 0.001%) e ao Allergan Soft Contact Lens Disinfection Solution (cloreto de trietanol aquil amônio 0.013% + timerosal 0.002%). Para cada espécie, trofozoítos e cistos foram avaliados separadamente, realizando-se um teste para o primeiro e dois para o segundo. Os protozoários foram suspensos em 2 ml da solução química e mantidos assim por quatro horas, seguindo-se de lavagem e posterior cultivo. Encontraram-se que o Flex-care não foi efetivo em eliminar *A. polyphaga* mas o foi em *A. castellanii*. A Allergan Soft Contact Lens Disinfection Solution não foi capaz de eliminar nenhuma das duas espécies em avaliação. Os resultados do estudo anterior contrariam aos nossos, onde o Flex-care mostrou-se efetivo em eliminar *A. polyphaga* e *A. castellanii* assim como o Hidrocare. No estudo de LUDWIG e col. (1986) foram realizados poucos testes de avaliação que pudessem permitir uma conclusão estatisticamente significante.

Quando ao estudo de LINDQUIST e col. (1987) onde L.C.G. contaminadas com *Acanthamoeba* sp foram submetidas à desinfecção com amônia quaternária, concluíram que este químico parece não ter capacidade de erradicar o parasito. É importante a metodologia aplicada no cultivo de L.C.G. contaminadas por microrganismos com capacidade de encistamento, como no caso das A.V.L.. Quando L.C.G. são colocadas em solução aquosa contaminada com *Acanthamoeba* as formas trofozoíticas movimentam-se e tendem a aderir em sua superfície, podendo esta aderência ocorrer em somente uma das faces da lente. Durante a desinfecção estes trofozoítos aderidos se encistam, perdendo capacidade de movimentação. Se durante o cultivo a face da L.C.G. contaminada com o protozoário ficar contrária a superfície do ágar os cistos não teriam como reconhecer condições ideais necessárias para o desencistamento, podendo muitas vezes este discutir levar a um resultado falso-negativo. LINDQUIST e col. (1987) utilizaram L.C.G. em seu estudo e não descreveram a técnica de semeadura empregada.

No presente estudo procuramos passar várias vezes cada face da lente em teste no ágar, propiciando ao cisto a possibilidade de se desprender da lente, ficando na superfície do ágar. Ainda, é importante referir que o fato de algumas soluções químicas terem a capacidade de adsorver a L.C.G., podendo serem liberadas posteriormente (KASPAR, 1976; MACKEN & GREEN, 1978), fez com que após passarmos as faces da L.C.G. centralmente no ágar, esta fosse colocada na periferia do meio de cultivo, ou seja, longe do provável local de semeadura, não permitindo que a liberação do químico adsorvido pudesse alterar as características do ágar, inibindo, assim, o crescimento das amebas.

Ainda, em relação à metodologia de pesquisa, ao se utilizar L.C.G. contaminadas com *Acanthamoeba* e soluções de desinfecção, foi realizado neste estudo a semeadura de todos os volumes onde as lentes permaneceram imersas nos diferentes métodos de desinfecção do Experimento I. Acreditamos que ao colocar as L. C. G. contaminadas com as amebas nas soluções, os parasitos poderiam se desprender e permanecer viáveis no fundo do compartimento e ao semearmos as lentes o crescimento seria negativo, apesar de o protozoário poder estar vivo na solução. Esta suposição foi amplamente contradiada pela ausência de crescimento amebiano em 100% das placas semeadas com os resíduos destas soluções.

SILVANY e col. (1987b) investigaram a capacidade de compostos químicos eliminarem *A. castellanii* e *A. polyphaga*. Relataram que as preparações compostas de timerosal + edetato, clorexidina + edetato, clorexidina 0.001% e peróxido de hidrogênio 3% foram capazes de eliminar as amebas, enquanto que ao ácido sórbico 1% + EDTA 0.1%, sorbato de potássio 0.13% + EDTA 0.1%, timerosal 0.001% e 0.004% e ao ácido sórbico 0.1% não foram. SILVANY e col. (1988), em estudo semelhante, comprovaram que timerosal a 0.001%, 0.002% ou 0.004% associado ao edetato é efetivo em eliminar *Acanthamoeba castellanii* e *Acanthamoeba polyphaga*, assim como o é timerosal associado ou com clorexidina e edetato ou com cloreto de amônio 0.013%. Entretanto, sorbato de potássio 0.13% com edetato ou ácido bórico 0.1% com edetato não o são.

Em nosso estudo, a associação de gluconato de clorexidina a 0.005% com timerosal 0.001% e edetato dissódico a 0.1% foi efetiva em eliminar *A. polyphaga*, *A. castellanii* e *A. astronyxis*, não a sendo para *Acanthamoeba* sp e *A. culbertsoni*. O cloreto de trietanol aquil amônio miramine a 0.0330 mg/ml com timerosal sódico a 0.023 mg/ml foi efetivo em eliminar todas as amebas por nós testadas, exceto a *Acanthamoeba* sp.

É interessante ressaltar que, tanto no Experimento II do nosso estudo como naqueles desenvolvidos por LUDWIG e col (1986) e SILVANY e col. (1987b), os protozoários que ficaram expostos aos químicos foram lavados antes de serem cultivados. Este procedimento se faz importante pois, o químico pode ficar adsorvido na parede do cisto sem ter, necessariamente, causado sua morte, podendo, após ser eliminado, ocorrer a passagem da forma cística para a forma infectante (trofozoítica). Também, se os cistos fossem cultivados sem prévia lavagem, os químicos poderiam ser liberados talvez influenciando na composição do ágar que deixaria de ser adequado. Este fato é comprovado através da comparação entre os resultados obtidos neste estudo avaliando-se *Acanthamoeba* sp, que apresentou positividade em 80% dos testes realizados com o Flex-care no Experimento I, onde as amebas não foram lavadas e no Experimento II, pós lavagem, não só o Flex-care positivou em 100% dos testes como também o Hidrocare, negativo no Experimento I, positivou em 80% dos testes. De maneira semelhante, *A. culbertsoni* que havia positivado em 80% dos testes realizados com Flex-care no Experimento I positivou em 100% para o mesmo químico no Experimento II.

A mesma cepa de *A. culbertsoni* foi avaliada, quanto a sensibilidade aos químicos Flex-care e Hidrocare, por FREITAS e col. (1988) e por nós, no presente estudo. A metodologia empregada pelos primeiros autores diferiu, em parte, da nossa, pois incluiu limpeza e enxágue da L. C.G. antes da desinfecção propriamente dita. É importante citar que FREITAS e col. (1988) concluíram serem estes químicos efetivos contra a *Acanthamoeba culbertsoni*, contrariando os resultados por nós obtidos neste estudo onde esta foi resistente ao Flex-care. Este fato nos leva a concluir que a limpeza e enxágue são passos importantes para eliminação desta espécie de ameba quando se utiliza o Flex-care. Ainda, no estudo de FREITAS e col. (1988), em um dos experimentos empregou-se o estudo da contribuição isolada do agente desinfetante ativo, sendo neste, a ameba pesquisada, sensível. Acreditamos que estes resultados contrariaram os nossos devido ao pequeno número de testes (três) empregados por FREITAS e col. (1988) para cada experimento.

Ao compararmos os métodos físico e químico, observamos que duas espécies, *Acanthamoeba* sp e *A. culbertsoni* foram mais resistentes a desinfecção química em relação à térmica, e esta diferença foi estatisticamente significativa. Estes resultados levam a deduzir que a assepsia térmica seria o método de eleição no tratamento de L.C.G. contaminadas com *Acanthamoeba*.

Quanto ao uso da desinfecção química nos casos de L.C.G. de alta hidratação (onde a desinfecção térmica é contra-indicada), esta pode ser empregada em algumas restrições, como, por exemplo, emprego de soluções para lavagem e enxágue sabidamente estéreis, de preferência preservadas e também educando o usuário de L.C.G. em relação aos riscos de contaminação e mostrando como evitá-los. Analisando, separadamente, os dois tipos de químicos empregados para estas espécies pareceu ser o Hidrocare mais efetivo em relação ao Flex-care, sendo, portanto, indicado para a realização de desinfecção química, apesar que acreditamos ser necessário avaliar um maior número de espécies.

É importante frisar que soluções aquosas contendo *Acanthamoeba* são capazes de contaminar L.C.G., fato este amplamente comprovado pela positividade de todos os controles do Experimento I, e estas lentes, apesar da patogênese ainda incerta, funcionam como vetores de transmissão destes protozoários ao olho.

Acanthamoeba sp, testada neste estudo, mostrou-se altamente resistente às desinfecções químicas propostas. Pode-se questionar que, por se tratar de uma cepa isolada recentemente (NOSE e col., 1988), apresentaria maior resistência, em comparação aquelas isoladas e mantidas em cultivo laboratorial durante muito tempo, como *A. polyphaga* e *A. castellanii* (NAGINGTON & RICHARDS, 1976) que terminariam por perder algumas de suas características próprias. Ou simplesmente, a cepa "per si" poderia ser dotada de características de alta resistência, independente da data de isolamento e idade do cultivo.

A avaliação de outras cepas, principalmente as isoladas das próprias lesões oculares, é interessante, uma vez que A.V.L. não têm ainda a relação parasito-hospedeiro bem determinada e elas parecem estar em transição para a vida parasitária. O estudo dos fatores ligados a resistência destes protozoários, ao meio em que vivem e ao hospedeiro, comprometido sistematicamente ou localmente, a nível ocular, poderia elucidar muitos aspectos da interação *Acanthamoeba* — organismo humano.

RESUMO

Desde 1980 vários casos de ceratite por *Acanthamoeba* têm sido diagnosticados e, ao contrário dos primeiros relatos onde o fator desencadeante era o trauma, atualmente a quase totalidade dos casos relaciona-se com o uso de lentes de contacto.

Estudos têm sido desenvolvidos para esclarecer o envolvimento destas lentes na fisiopatologia da ceratite por *Acanthamoeba*. Dentre estes, a avaliação dos diferentes sistemas de desinfecção empregados na sua manutenção, aponta como um assunto controverso e de interesse científico, uma vez que, um grande número de espécies e cepas estão envolvidas, apresentando, cada uma delas, um comportamento diferente, em relação a estes sistemas.

Este estudo teve por objetivo testar a susceptibilidade de cinco diferentes espécies de *Acanthamoeba*, *A. astronyxis*, *A. Polyphaga*, *A. castellanii*, *A. Culbertsoni* e *Acanthamoeba* sp a um sistema de desinfecção térmica (unidades elétricas de assepsização térmica) e dois sistemas de desinfecção química (Hidrocare e Flex-care).

Dois experimentos foram realizados. No primeiro, lentes de contacto gelatinosas foram contaminadas com as diferentes espécies do protozoário e em seguida submetidas a desinfecção e cultivo. No segundo, cistos e trofozoítos das mesmas espécies foram expostos diretamente aos sistemas de desinfecção, sendo posteriormente lavados, com o objetivo de eliminar a solução química eventualmente presente na superfície da ameba.

O controle do crescimento amebiano foi realizado através de exame diário, por vinte dias, com microscopia óptica.

O crescimento foi definido pelo aparecimento de formas trofozoíticas.

A desinfecção térmica mostrou-se efetiva em 100% dos testes realizados com as cinco diferentes espécies de *Acanthamoeba* avaliadas. *A. culbertsoni* resistiu à desinfecção química com Flexcare, sendo susceptível ao Hidrocare, e *Acanthamoeba* sp resistiu aos dois compostos testados.

O estudo permitiu concluir que, dos métodos testados, a desinfecção térmica é a única totalmente efetiva para a desinfecção de lentes de contacto gelatinosas contaminadas com *Acanthamoeba*.

SUMMARY

Acanthamoeba corneal infection has been reported in some persons who wear soft contact lenses.

In this study five different species of *Acanthamoeba* (*A. astronyxis*, *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni* and *Acanthamoeba* sp) were tested against two chemical (Hidrocare and Flex-care) and one thermal (heat) disinfection units soft contact lens disinfection systems according to the manufacturer's instructions.

For each specie and disinfection system ten tests were performed in separate trials, and with appropriate controls.

In a first time soft contact lenses were infected with *Acanthamoeba* spp and then submitted to the disinfection systems.

In a second time suspension of *Acanthamoeba* spp cysts and trophozoites were directly tested and after disinfection the organisms were washed three times.

A. culbertsoni and *Acanthamoeba* sp were capable to resist to Flex-care in the first study and in the second *A. culbertsoni* was capable to resist to Flex-care and *Acanthamoeba* sp to Flex-care and Hidrocare.

The amoebic growing was considering positive when trophozoitic forms appeared.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACANTHAMOEBA keratitis associated with contact lenses: United States. *MMWR*, 35: 405-8, 1986.
- ACANTHAMOEBA keratitis in soft contact lens wearers. *MMWR*, 36: 397-404, 1987.
- AURAN, J. D.; STARR, M. B.; JAKOBIEC, F. A. — *Acanthamoeba* keratitis: a review of the literature. *Cornea*, 6: 2-26, 1987.
- BROWN, T. J.; CURSONS, R. T. M.; KEYS, E. A. — Amoebae from antarctic soil and water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44: 491-3, 1982.
- COHEN, E. J.; BUCHANAN, H. W.; LAUGHREA, P. A.; ADAMS, C. P.; GALENTINE, P. G.; VISVESVARA, G. S.; FOLBERT, R.; ARENTSEN, J. J.; LAIBSON, P. R. — Diagnosis and management of *Acanthamoeba* keratitis. *Am. J. Ophthalmol.*, 100: 389-95, 1985.
- COHEN, E. J.; PARLATO, C. J.; ARENTSEN, J. J.; GENVERT, G. I.; EAGLE Jr., R. C.; WIELAND, M. R.; LAIBSON, P. R. — Medical and surgical treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Am. J. Ophthalmol.*, 103: 615-23, 1987b.
- CURSONS, R. T. M.; BROWN, T. J.; KEYS, E. A. — Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae: in axenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40: 62-66, 1980.
- DAVIS, R. M.; SCHROEDER, R. P.; ROWSEY, J. J.; JENSEN, H. G.; TRIPATHI, R. C. — *Acanthamoeba* keratitis and infectious crystalline keratopathy. *Arch. Ophthalmol.*, 105: 1524-7, 1987.
- DE JONCKHEERE, J. F. — Hospital hydrotherapy pools treated with ultra violet light: bad bacteriological quality and presence of thermophilic. *Naegleria*. *J. Hyg.*, 88: 205-14, 1982.
- DE JONCKHEERE, J. F. & MICHEL, R. — Species identification and virulence of *Acanthamoeba* strains from human nasal mucosa. *Parasitol. Res.*, 74: 314-6, 1988.
- DUMA, R. J. — Primary amoebic meningoencephalitis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 3: 163-92, 1972.
- EPSTEIN, R. J.; WILSON, L. A.; VISVESVARA, G. D.; PLOURDE Jr., E. G. — Rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis from corneal scrapings using indirect fluorescent antibody staining. *Arch. Ophthalmol.*, 104: 1318-21, 1986.
- ERIKSEN, S. — A rational comparison of heat vs cold disinfection of hydrophilic lenses. *Contact Lens J.*, 7: 18-23, 1978.
- FICHMAN, S. H. — Consideration of a soft lens chemical disinfecting solution under field conditions. *Can. J. Ophthalmol.*, 10: 51-4, 1975.
- FORONDA, A. S. — Observações sobre amebas de vida livre potencialmente patogênicas. São Paulo, 1979. (Tese — doutorado — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
- FORONDA, A. S.; BAZITO FILHO, O.; ROCHA, A. A.; BRANCO, S. M. — Aspectos ecológicos de amebas de vida livre em piscinas de São Paulo. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PROTOZOLOGIA, 1. Caxambú, 1985. Resumos. Caxambú, 1985. p. 18.
- FREITAS, D.; FORONDA, A. S.; SATO, E. H.; BELFORT Jr., R.; URAS, R. — *Acanthamoeba culbertsoni*: sensibilidade aos diferentes métodos de desinfecção de lentes de contacto hidrofílicas. *Arq. Bras. Oftalmol.*, 51: 143-7, 1988.
- HAMBURG, A. & DE JONCKHEERE, J. F. — Amoebic keratitis. *Ophthalmologica (Basel)*, 181: 74-80, 1980.
- HAMILTON, W. A. — Membrane active antibacterial compounds. In: HUGO, W. B., ed. — *Inhibition and destruction of the microbial cell*. London, Academic Press, 1971. p. 78-92.
- HOLLAND, G. N. & DONZIS, P. B. — Rapid resolution of early *Acanthamoeba* keratitis after epithelial debridement. *Am. J. Ophthalmol.*, 104: 87-9, 1987.
- HOULSBY, R. D.; GHAIJAR, M.; CHAVEZ, G. — Microbiological evaluation of soft contact lens disinfecting solutions. *J. Am. Optom. Assoc.*, 55: 205-11, 1984.
- JONES, B. R.; MCGILL, J. I.; STEELE, A. D. M. — Recurrent suppurative kerato-uveitis with loss of eye due to infection by *Acanthamoeba castellanii*. *Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.*, 95: 210-3, 1975a.
- JONS, D. B. — *Acanthamoeba*: the ultimate opportunist? *Am. J. Ophthalmol.*, 102: 527-30, 1986.
- JONES, D. B.; VISVESVARA, G. S.; ROBINSON, N. M. — *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. *Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.*, 95: 221-32, 1975b.
- JOSEPHSON, J. E. & CAFFERY, B. F. — Hydrogel lens solutions. *Int. Ophthalmol. Clin.*, 21: 163-242, 1981.
- KASPAR, H. — Binding characteristics and microbiological effectiveness of preservatives. *Aust. J. Ophthalmol.*, 59: 4-9, 1976.
- KEY III, S. N.; GREEN, W. R.; WILLAERT, E.; STEVENS, A. R.; KEY Jr., S. N. — Keratitis due to *Acanthamoeba castellanii*: a clinicopathologic case report. *Arch. Ophthalmol.*, 98: 475-9, 1980.
- KINGSTON, D. & WARHURST, D. C. — Isolation of amoeba from the air. *J. Méd. Microbiol.*, 2: 27-36, 1969.
- LINDQUIST, T. D.; DOUGHMAN, D. J.; RUBENSTEIN, J. B.; MOORE, J. W. — *Acanthamoeba* infected hydrogel contact lenses: susceptibility to disinfection. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 28 (suppl.): 371, 1987. (abstract, 5) (ARVO abstracts).
- LUDWIG, I. H.; MEISLER, D. M.; RUTHERFORD, I.; BICAN, F. E.; LANGSTON, R. H. S.; VISVESVARA, G. S. — Susceptibility of *Acanthamoeba* to soft contact lens disinfection systems. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 27: 626-8, 1986.
- LUND, O. E.; STEFANI, F. H.; DECHANT, W. — Amoebic keratitis: a clinic-pathological case report. *Br. J. Ophthalmol.*, 62: 373-5, 1978.
- MACKKEEN, D. L. & GREEN, K. — Chlorhexidine kinetics of hydrophilic contact lenses. *J. Pharm. Pharmacol.*, 30: 678-82, 1978.
- MARINES, J. M.; OSATO, M. S.; RAMON, L. F. — The value of calcofluor white in the diagnosis of mycotic and *Acanthamoeba* infections of the eye and ocular adnexa. *Ophthalmology*, 94: 23-6, 1987.
- MARTINEZ, A. J. — Free-living amoebas: natural history, prevention, diagnosis, pathology, and treatment of diseases. Boca Raton, CRC Press, 1985. 156p.
- McBRIDE, M. E. — Evaluation of microbial flora of the eye during wear of soft contact lenses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37: 233-6, 1979.
- MEISLER, D. M.; RUTHERFORD, I.; BICAN, F. E.; LUDWIG, I. H.; LANGSTON, R. H. S.; HALL, U. S.; RHINEHART, L.; VISVESVARA, G. S. — Susceptibility of *Acanthamoeba* to surgical instrument sterilization techniques. *Am. J. Ophthalmol.*, 99: 724-5, 1985.
- MOORE, M. B.; McCULLEY, J. P.; LUCKENBACH, M.; GELENDER, H.; NEWTON, C.; McDONALD, M. B.; VISVESVARA, G. S. — *Acanthamoeba* keratitis associated with soft contact lenses. *Am. J. Ophthalmol.*, 100: 396-407, 1985.
- MOORE, M. B.; McCULLEY, J. P.; NEWTON, C.; COBO, L. M.; FOULKS, G. N.; O'DAY, D. M.; JOHNS, K. J.; DRIEBE, W. T.; WILSON, L. A.; EPSTEIN, R. J.; DOUGHMAN, D. J. — *Acanthamoeba* keratitis: a growing problem in soft and hard contact lens wearers. *Ophthalmology*, 94: 1654-61, 1987.
- NAGINGTON, J.; WATSON, P. G.; PLAYFAIR, T. J.; MCGILL, J.; JONES, B. R.; STEELE, A. D. M. — Amoebic infection of the eye. *Lancet*, 2: 1537-40, 1974.
- NORTON, D. A.; DAVIES, D. J. G.; RICHARDSON, N. E.; MEAKIN, B. J.; KEALL, A. — The antimicrobial efficiencies of contact lens solutions. *J. Pharm. Pharmacol.*, 26: 841-6, 1974.
- NOSE, W.; SATO, E. H.; FREITAS, D.; RIGUEIRO, M. P.; FORONDA, A. S.; KWITKO, S.; BELFORT Jr., R.; BURNIER Jr., M.; FONT, R. — Úlcera de córnea por *Acanthamoeba*: quatro primeiros casos brasileiros. *Arq. Bras. Oftalmol.* 51: 223-6, 1988.
- PAGE, F. C. — Taxonomic criteria for limax Amoebae, with descriptions of 3 new species of *Hartmannella* and 3 of *Vahlkampfia*. *J. Protozool.*, 14: 499-21, 1967.
- PHILLIPS, A. J. — Contact lens solutions. *Contact Lens J.*, 6: 3-23, 1977.
- RIVERA, F.; GALVÁN, M.; ROBLES, E.; LEAL, P.; GONZÁLEZ, L.; LACY, M. — Boiled mineral waters polluted by protozoa in Mexico. *J. Protozool.*, 28: 54-6, 1981.
- SALAZAR, H. C.; MOURA, H.; RAMOS, R. T. — Isolamento de Amebas de vida livre a partir de água mineral engarrafada. *Rev. Saúde Pública*, 16: 261-7, 1982.
- SAWYER, T. K.; VISVESVARA, G. S.; HARKE, B. A. — Pathogenic amoebas from brackish and ocean sediments, with a description of *Acanthamoeba hatchetti*, n. sp. *Science*, 196: 1324-5, 1977.
- SIBLEY, M. J. — Disinfection solutions. *Int. Ophthalmol. clin.*, 21: 237-47, 1981.
- SILVANY, R. E.; WOOD, T. S.; BOWMAN, R. W.; McCULLEY, J. P. — The effect of preservatives in contact lens solutions on two species of *Acanthamoeba*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 28 (suppl.): 371, 1987b. (abstract, 6) (ARVO abstracts).
- SILVANNY, R. E.; WOOD, T. S.; BOWMAN, R. W.; MOORE, M. B.; McCULLEY, J. P. — The effect of contact lens solutions on

- two species of *Acanthamoeba*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 29 (suppl.): 253, 1988. (abstract, 2) (ARVO abstracts).
- SIMITZIS, A. M.; LE GOFF, F.; L'AZOU, M. T. — Isolement d'amibes libres à partir de la muqueuse nasale de l'homme. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 54: 121-7, 1979.
- STEHER-GREEN, J. K.; BAILEY, T. M.; BRANDT, F. H.; CARR, J. H.; BOND, W. W.; VISVESVARA, G. S. — *Acanthamoeba* keratitis in soft contact lens wearers: a case control study. *J. Am. Méd. Assoc.*, 258: 57-60, 1987.
- STENSON, S. — Soft contact lenses and corneal infection. *Arch. Ophthalmol.*, 104: 1287-9, 1986.
- STERN, G. A. — Update on the medical management of corneal and external eye diseases, corneal transplantation, and keratorefractive surgery. *Ophthalmology*, 95: 842-53, 1988.
- WANG, S. S. & FELDMAN, H. A. — Isolation of *Hartmannella* species from human throats. *N. Engl. J. Med.*, 277: 1171-9, 1967.
- WECHSLER, S. & GEORGE, N. C. — Disinfection of hydrophilic lenses. *J. Am. Optom. Assoc.*, 52: 179-86, 1981.
- WELLINGS, F. M.; AMUSO, P. T.; CHANG, S. L.; LEWIS, A. L. — Isolation and identification of pathogenic *Naegleria* from Florida Lakes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34: 661-7, 1977.
- WILHELMUS, K. R. — Review of clinical experience with microbial keratitis associated with contact lenses. *CLAO J.*, 13: 211-4, 1987.
- WILHELMUS, K. R.; OSATO, M. S.; FONT, R. L.; ROBINSON, N. M.; JONES, D. B. — Rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using calcofluor white. *Arch. Ophthalmol.*, 104: 1309-12, 1986.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS — FACULDADE DE MEDICINA DA USP

Será realizado o curso de Oftalmologia: "ESTADO ATUAL E RECENTES PROGRESSOS EM CIRURGIA DO SEGMENTO ANTERIOR", dias 07 e 08 de Abril de 1989, no teatro da Faculdade de medicina da USP, Av. Dr. Arnaldo, nº 455. Entre os palestrantes: — Dr. Newton Kara José, Dr. Carlos Arieta, Dr. Rubens Belfort Jr., Dr. Hisashi Suzuki,

Dr. Suel Abujamra, Dr. Carlos Hirata, Dr. José Américo Bonatti, Dr. Samir Bechara, Dr. Walton Nosé, Dr. Walter Takahashi, Dr. Nilo Holschuh entre outros. Informações: Sra. Regina nos telefones: (011) 211-5167 e (011) 813-0675.

XI CURSO INTERAMERICANO DE OFTALMOLOGIA CLÍNICA

El fundador y director del Curso, Dr. Don Nicholson, Les invita a todos los oftalmólogos de habla hispana a asistir a este curso clínico avanzado presentado por los profesores, ex-alumnos, y invitados del honor del Bascom Palmer Eye Institute. Interpretación simultanea (Inglés-Español).

Fecha del Curso: 07-11 de novembro de 1989.

La correspondencia puede dirigirse al:

Don Nicholson, M. D. — XI Curso Interamericano —
Bascom Palmer Eye Institute — P. O. Box 016880 —
Miami, Florida 33101 — USA

Temas del XI Curso Interamericano:

Glaucoma
Catarata/LIO
Neuro-Oftalmologia
Avances Recientes
Practica actual
Uveitis
Enfermedades Externas
Trauma