



UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**IMPLANTAÇÃO E AVALIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
ENTRE *Entamoeba histolytica* E *Entamoeba dispar* EM AMOSTRAS
FECAIS**

FRED LUCIANO NEVES SANTOS

Salvador
2007



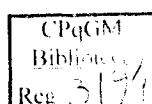
FRED LUCIANO NEVES SANTOS

**IMPLANTAÇÃO E AVALIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
ENTRE *Entamoeba histolytica* E *Entamoeba dispar* EM AMOSTRAS
FECAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em
Patologia Experimental da Universidade Federal da Bahia,
como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Neci Matos Soares

**SALVADOR
2007**



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S237i Santos, Fred Luciano Neves
Implantação e avaliação do diagnóstico diferencial entre *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* em amostras fecais / Fred Luciano Neves Santos. –2007.
99 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Faculdade de Farmácia, 2007.
Orientador: Prof^a. Dr^a. Neci Santos Soares.

1. E. *histolytica*/E.*dispar*. 2. Diagnóstico diferencial. 3. Epidemiologia. I. Título.


CDU 576.8: 614.4

“IMPLANTAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA INFECÇÃO CAUSADA PELA
Entamoeba histolytica E Entamoeba dispar E AVALIAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS
CLÍNICAS”

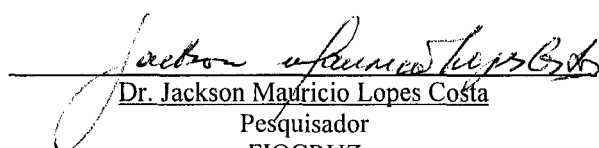
FRED LUCIANO NEVES SANTOS

FOLHA DE APROVAÇÃO

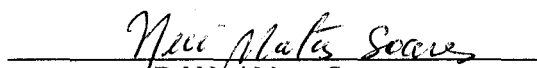
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr^a Maria Aparecida Gomes
Professora Associada
UFMG



Dr. Jackson Mauricio Lopes Costa
Pesquisador
FIOCRUZ



Dr^a Néci Matos Soares
Professora Adjunta
UFBA

**“Felicidade é a certeza de que nossa
vida não está passando inutilmente”**

Érico Veríssimo

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos pelo apoio e carinho. Minha profunda admiração e gratidão. Sem vocês não teria chegado até aqui!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Itamar e Edna e irmãos Faber e Fabine pela constância em minha vida. Molas mestras de meu equilíbrio.

À amiga e professora Neci Matos Soares pelo apoio e muita paciência em todo o decorrer do curso.

À professora Marilda de Souza Gonçalves pelo apoio.

Ao Laboratório de Amebíase da Universidade Federal de Minas Gerais pela doação das cepas de *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* utilizadas neste estudo e pelo treinamento realizado.

À amiga Lorena de Brito Faro por ter me possibilitado a oportunidade de coletar as amostras referentes ao Sistema Privado de Saúde e ao amigo Luciano Passos por me possibilitar a coleta dos pacientes provenientes do HUPES.

Ao professor Marco Rego pela orientação no desenho do estudo.

Aos meus amigos André Alcântara, Clarissa Gurgel, Bruno Veloso, José Pereira, Wendel Vilasboas pelo constante apoio e incentivo.

À Professora Ângela Maria Ornelas da Faculdade de Medicina Veterinária (UFBA) por ter cedido seu laboratório para a utilização do aparelho de ultra-som.

Ao professor Dr. Moacir Paranhos, do Laboratório Central de Saúde Pública Gonçalo Moniz – LACEN, por ter gentilmente cedido seu laboratório para a realização do estudo morfométrico dos cistos.

À FABESB pelo apoio financeiro, sem este o trabalho não poderia ser realizado.

A todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

E, finalmente e nem por isso menos importante, à Deus por estar firmemente ao meu lado mesmo nos momentos que me esquecia de Sua presença.

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	15
1.1 Revisão da Literatura	17
1.1.1 Histórico	17
1.1.2 O Parasito	19
1.1.3 <i>Entamoeba histolytica</i> X <i>Entamoeba dispar</i>	25
1.1.4 Patogenia	26
1.1.4.1 Moléculas de Virulência	26
1.1.4.2 Amebíase Intestinal	28
1.1.4.3 Amebíase Extra-intestinal	32
1.1.5 Epidemiologia	33
1.1.6 Sinais e Sintomas	37
1.1.7 Diagnóstico	39
1.1.8 Justificativa	43
2.0 OBJETIVOS	44
2.1 Geral	44
2.2 Específicos	44
3.0 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 Pacientes/ Amostragem	45
3.2 Exame Coproparasitológico	46
3.3 Diagnóstico Molecular	48
3.3.1 Concentração dos cistos	48

3.3.2 Extração do DNA	49
3.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase	50
3.3.4 Eletroforese em Gel de Agarose	52
3.3.5 Avaliação da Reprodutibilidade da Multiplex-PCR	52
3.4 Análise Morfométrica	53
3.5 Pesquisa de coproantígenos	53
3.6 Análise Estatística	54
4.0 RESULTADOS	56
5.0 DISCUSSÃO	71
6.0 ASPECTOS IMPORTANTES NO ESTUDO	80
7.0 CONCLUSÕES	81
8.0 REFERÊNCIAS	82
9.0 ANEXOS	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcPo	Anticorpo policlonal
ADCC	Citotoxicidade dependente de anticorpo
CD	Grupo de diferenciação (do inglês, <i>cluster of differentiation</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxiribonucleotídeo tri-fosfatado
ELISA	Do inglês, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Gal	Galactose
GalNAc	N-acetil-D-galactosamina
GM-CSF	Fator estimulador de colônia - granulócito e monócito
HLA	Antígeno leucocitário humano (do inglês, <i>human leukocyte antigen</i>)
HUPES	Hospital Universitário Professor Edgard Santos
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
INF	Interferon
kDa	Kilodáton
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública Gonçalo Moniz
LPS	Lipopolissacarídeos
LPG	Lipofosfoglicano
LPPG	Lipofosfopeptideoglicano
M	Molar
MFLI	Fator de inibição de locomoção monocitária
Mg	miligramas
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
ml	mililitros
mM	Milimolar
Nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2	Prostaglandina F2
PUMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno
RNA	Ácido ribonucléico
TNF	Fator de necrose tumoral
TLRs	Receptores <i>Toll-like</i>
U	Unidades Internacionais
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UV	Ultravioleta
µg	Micrograma
µM	Micrômetro

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Trofozoítos de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*. Figura A, representação esquemática de um trofozoíto característico da espécie. Observar o núcleo: cariossoma central; cromatina regularmente distribuída na periferia; fibrilas de linina (linhas que ligam a cromatina ao cariossoma). Figura B, trofozoíto corado pela técnica de tricrômico mostrando aspectos nucleares típicos desta espécie. Figura C, trofozoíto em cultura axênica não corado contendo eritrócitos ingeridos..... 23
- Figura 2. Cistos de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*. Figura A, desenho de um cisto típico da espécie. Observar núcleos, cariossoma central, cromatina regularmente distribuída na periferia do núcleo, fibrilas de linina, presença de bastões cromatóides e citoplasma granuloso. Figura B, cisto não corado. Observar a refringência da parede cística, núcleos pouco visíveis. Figura C, cisto mononucleado corado pelo iodo. Figura D, cisto trinucleado corado pelo iodo. Observar espaço esbranquiçado representado pelos corpos cromatóides não corados. Figura E, cisto trinucleado corado pela hematoxilina férrica. Observar a presença dos bastões cromatóides. Figura F, cistos corados pelo tricrômico..... 24
- Figura 3. Fluxograma das amostras analisadas pelos laboratórios da rede Priva e Pública de Salvador-BA, no período de 11/02/2006 a 20/08/2006. Numeração em vermelho indica a prevalência do complexo *E. histolytica/E. dispar* nas amostras analisadas..... 60
- Figura 4. Imagem aérea do município de Salvador-BA e região metropolitana mostrando a distribuição dos postos de atendimento dos laboratórios da rede privada: Dirceu Ferreira, Qualitech e Datalab; e da rede pública: HUPES e Faculdade de Farmácia (UFBA). Fonte: www.googleearth.com..... 61
- Figura 5. Produtos amplificados através de Multiplex-PCR com *primers* Eh-R/Eh-L e Ed-L/Ed-R. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. PM – padrão de peso molecular – 100 pb, 1 – controle negativo, 2 – controle positivo (*E. histolytica* – 427 pb), 3 – controle positivo (*E. dispar* – 195 pb), 4 a 6 – amostras de fezes negativas para o complexo *E. histolytica/E. dispar* contendo 3 µl de DNA de *E. histolytica* proveniente de cultura axênica (cepa HM-1), 7 e 8 – amostras positivas para *E. dispar*, 9 – amostra negativa para o complexo *E. histolytica/E. dispar*..... 64
- Figura 6. Produtos amplificados através de Multiplex-PCR. Avaliação da positividade da PCR utilizando amostras de fezes com padrões distintos de diluição. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. M – padrão de peso molecular – 100 pb, 1-

controle negativo, 2 - controle positivo (*E. histolytica* – 427 pb), 3 – controle positivo (*E. dispar* – 195 pb), 4 - amostra de *E. dispar* (E35) amplificada sem diluição, 5 – diluição de 1:20, 6 – diluição 1:40, 7 – diluição 1:80, 8 – diluição 1:160, 9 – amostra de *E. dispar* (E108) amplificada sem diluição, 10- diluição 1:20, 11 – diluição 1:40, 12 – diluição 1:80 e 13 – diluição 1:160..... 65

Figura 7. Avaliação da reprodutibilidade intra-teste. Produtos amplificados através de Multiplex-PCR. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. M – padrão de peso molecular – 100 pb, 1- controle negativo, 2 - controle positivo (*E. histolytica* – 427 pb), 3 – controle positivo (*E. dispar* – 195 pb), 4 e 5 - amostras de fezes negativas para o complexo *E. histolytica/E. dispar* contendo 3 µl de DNA de *E. histolytica* proveniente de cultura axênica, cepa HM-1(Eh1 e Eh2), 6 -7 – amostras positivas para *E. dispar* (E108 e E139), 8 - amostra negativa para o complexo *E. histolytica/E. dispar*..... 67

Figura 8. Avaliação da reprodutibilidade inter-teste. Produtos amplificados através de Multiplex-PCR. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. PM – padrão de peso molecular – 100 pb, 1- controle negativo, 2 - controle positivo (*E. histolytica* – 427 pb), 3 – controle positivo (*E. dispar* – 195 pb), 4 a 9 - amostras positivas para *E. dispar* amplificadas em diferentes períodos (E35), 10 - amostra negativa para o complexo *E. histolytica/E. dispar*..... 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Prevalência da infecção causada pelo complexo <i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i> em pacientes atendidos nos laboratórios da rede privada e pública de Salvador-BA, no período de 11/02/2006 a 20/08/2006.....	62
Tabela 2.	Cistos de <i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i> e <i>Entamoeba coli</i> em amostras de fezes analisadas pelos métodos de sedimentação espontânea, formol-éter, sulfato de zinco e sacarose.....	63
Tabela 3.	Avaliação dos padrões de diluição do DNA purificado de amostras fecais positivas para o complexo <i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i> (n=262) e do número de cistos presentes nas fezes na amplificação das amostras através da Multiplex-PCR.....	66
Tabela 4.	Análise das variáveis sócio-econômicas de 262 pacientes com resultado coproparasitológico positivo para o complexo <i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i> , atendidos por laboratórios da rede privada e pública de saúde de Salvador-BA, no período de 11/02/2006 e 20/08/2006.....	69
Tabela 5.	Análise dos hábitos de consumo e tratamento de água e alimentos crus de 262 pacientes com resultado coproparasitológico positivo para o complexo <i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i> , atendidos por laboratórios da rede privada e pública de saúde de Salvador-BA, no período de 11/02/2006 e 20/08/2006.....	70

RESUMO

A amebíase é uma infecção causada pela *Entamoeba histolytica* e representa um risco em potencial à saúde, em quase todos os países onde as barreiras sanitárias são inadequadas. É a segunda causa de mortalidade entre as parasitoses, alcançando em torno de 100.000 óbitos anuais. Com a descoberta da *Entamoeba dispar*, organismo comensal morfologicamente idêntico e geneticamente distinto da *E. histolytica*, a prevalência da infecção tem sido modificada. Neste estudo foi padronizada a reação em cadeia da polimerase para diagnóstico específico das amebas do complexo *E. histolytica/E. dispar* e aplicada para avaliar a prevalência da infecção em indivíduos atendidos em laboratórios da rede privada e pública de Salvador-BA. Amostras fecais de 52.704 pacientes, provenientes de 27 postos de coleta distribuídos em várias localidades, foram submetidas a exames coproparasitológicos. As amostras positivas para o complexo *E. histolytica/E. dispar* (n=262) tiveram seus cistos concentrados por meio da técnica de formol-éter para posterior extração do DNA e diagnóstico através da PCR. Foi observada uma prevalência de 3.4% para o complexo *E. histolytica/E. dispar*, sendo mais freqüente nas amostras provenientes do serviço público de saúde (5.0%) do que naquelas do serviço privado (3.2%). Através da PCR foi demonstrado que 86.6% destes pacientes estavam verdadeiramente infectados pela *E. dispar*. Para o restante dos pacientes (14.4%), a PCR foi negativa tanto para *E. histolytica* como para *E. dispar*. No ensaio imunoenzimático foi confirmado que estes pacientes não estavam infectados pela *E. histolytica* e o estudo morfométrico mostrou que o tamanho dos cistos é compatível com as amebas do complexo, afastando a possibilidade de infecção por *E. hartmanni*. Possivelmente, a presença de inibidores enzimáticos nas fezes diminuiu a sensibilidade da PCR. No entanto, é uma metodologia eficaz para a diferenciação das espécies pertencentes ao complexo devido à sua reprodutibilidade e elevadas especificidade e sensibilidade.

Palavras-chave: *E. histolytica/E. dispar*; Diagnóstico Diferencial; Epidemiologia.

ABSTRACT

The amoebiasis is an infection caused by *Entamoeba histolytica* and it represents a potential health risk in almost all the countries where health barriers are not appropriate. Among parasites diseases, it is the second highest of mortality cause and it reaches around 100,000 deaths each year. Since *Entamoeba dispar* (a commensal organism with the same morphological features and different from the genetical point of view) was found, the prevalence of the infection has been modified. This study has standardized the Polimerase Chain Reaction (PCR), applied to the specific diagnosis of amoeba of the *E. histolytica/E. dispar* complex and applied to evaluate the prevalence of the infection among the assisted patients in private and public laboratories in Salvador City, Bahia State, Brazil. Stool samples obtained from 52.704 patients who were assisted in 27 sampling centers distributed in different places had been processed for parasitological examinations. The positive samples for *E. histolytica/E. dispar* (n=262) had their cysts concentrated through formol-ether technique for subsequent PCR technique. A 3.4% prevalence was observed for the *E. histolytica/E. dispar* complex and it happened more often in the samples which came from the public health laboratories (5.0%) than those which came from the private ones. It has been demonstrated, via PCR, that 86.6% of the patients were really infected by *E. dispar*. For the remaining patients (14.4%), the PCR application showed negative for both *E. histolytica* and *E. dispar*. When immune-enzymatic trials were performed it was confirmed that these patients were not infected by *E. histolytica* and the morphometric study showed that the cyst sizes were compatible with the amoeba of the complex. It excluded the possibility of *E. hartmanni* infection. It was possible the enzymatic inhibitors, present in the stools, may decrease the PCR sensibility. However, it is an effective technique for distinguishing the species which belong to the complex due its reproducibility and higher specificity and sensibility.

Keywords: *Entamoeba histolytica*; Amoebiasis; Physiopathogenesis; Diagnosis.

1. INTRODUÇÃO

A amebíase é uma infecção causada pelo protozoário *Entamoeba histolytica*, da família *Endamoebidae*, do filo Sarcomastigophora e classe Sarcodina. Os protozoários desta classe são organismos que se movem e incorporam alimentos através de pseudópodes.

A *E. histolytica* possui distribuição cosmopolita e representa um risco à saúde nos países onde as barreiras sanitárias são inadequadas (Ravdin, 1995). Estima-se que 500 milhões de indivíduos em todo o mundo estejam infectados pela *E. histolytica*, havendo entre 40.000 a 100.000 óbitos anuais, tornando a amebíase a segunda causa de morte dentre as doenças parasitárias (Walsh, 1988). No Brasil, esta infecção também constitui um sério problema de Saúde Pública, apresentando maior prevalência nas populações de nível sócio-econômico mais baixo e condições precárias de saneamento básico, resultando em altos índices de morbidade (Ferreira et al., 1997; Santos et al., 2005). Em vários estados brasileiros tem sido demonstrada uma elevada prevalência da *E. histolytica*. Em Manaus (Amazonas), a infecção atinge 6.8% da população (Benetton et al., 2005). Em Fortaleza (Ceará), 14.9% da população de baixa renda (Braga et al., 2001) e em Belém (Pará) 29.5% dos indivíduos residentes na região metropolitana (Silva et al., 2005). Os estudos realizados no estado de Pernambuco e na cidade de Belo Horizonte (MG) demonstraram que a ocorrência da *E. histolytica* é rara, confirmando somente a presença da *E. dispar* (Dourado et al., 2006; Oliveira-Costa et al., 2006). Nas demais regiões brasileiras, não há estudos que retratem a prevalência da *E. histolytica*.

Após a infecção do hospedeiro via ingestão de cistos, os trofozoítos colonizam o lúmen intestinal onde multiplicam-se e vivem como comensais, usando bactérias e restos

celulares como fontes de energia. Entretanto, quando os trofozoítos penetram na mucosa intestinal, provocam uma reação inflamatória que pode levar à destruição do tecido envolvido (Ravdin, 1995). Muitos estudos procuram identificar e caracterizar a base molecular da reação citolítica, que é iniciada a partir do contato íntimo entre a célula-alvo e o parasito. Após contato estabelecido pelo reconhecimento de moléculas de galactose (Gal) ou N-acetil-D-galactosamina (GalNAc), presentes na superfície das células-alvo, por lectinas expressas pelo parasito, dispara-se uma cascata de sinalização intracelular, ocorrendo liberação de moléculas protéicas conhecidas como amebaporo (Guerrant et al., 1981). Estas moléculas inserem-se na membrana da célula-alvo formando canais iônicos (Young et al., 1982; Rosenberg et al., 1989). Além disso, o parasito libera cisteína proteinases que são responsáveis pela degradação da matriz extracelular facilitando, dessa forma, a invasão tecidual (Keene et al., 1986). Em poucos minutos a célula torna-se intumescida, com a formação de uma bolha citoplasmática, indicando a perda da permeabilidade da membrana plasmática e, como consequência, ocorre a morte celular (Ravdin et al., 1980; Beminghamen & Leippe, 1997).

A *Entamoeba dispar*, organismo morfológicamente idêntico à *E. histolytica*, é capaz de causar lesões intestinais focais em animais de laboratório, como gatos, gerbilos e cobaias (Markell et al., 2003). No homem vive como um comensal estável e avirulento produzindo um estado de portador assintomático, sendo aproximadamente nove a dez vezes mais prevalente que a *E. histolytica* (Allanson-Jones et al., 1986). Outras espécies de ameba como, por exemplo, a *Entamoeba hartmanni* e a *Entamoeba coli*, são capazes de infectar o homem e não produzem ações patogênicas.

O diagnóstico laboratorial do complexo *E. histolytica*/*E. dispar* é realizado rotineiramente através da demonstração microscópica de cistos e/ou trofozoítos no

sedimento fecal. No entanto, para a identificação da espécie é necessária a realização de exames que se baseiam na detecção de coproantígenos e/ou antígenos circulantes através de anticorpos monoclonais (Huston et al., 1999). Outra metodologia capaz de diferenciar as espécies é a reação em cadeia da polimerase, baseada na detecção de DNA, utilizando sondas espécie-específicas (Evangelopoulos et al., 2000).

1.1 Revisão da Literatura

1.1.1 Histórico

Em 1875, a *E. histolytica* foi descrita por Lösh, médico Russo de São Petersburgo, que observou o parasito nas fezes de um indivíduo com disenteria recidivante. No entanto, não a considerou como uma espécie patogênica e a denominou *Amoeba coli* (Lösh, 1875 apud Jackson, 1998). Em 1883, Koch observou cinco casos de disenteria no Egito, dois dos quais com abscessos hepáticos, onde foram encontradas numerosas amebas idênticas àquelas observadas por Lösh (Koch, 1883, apud Clark, 1998). Em 1886, Kartullis descreveu 150 casos de disenteria também no Egito, com a presença de amebas com sua forma vegetativa como a causa da “disenteria tropical” e do “abscesso tropical do fígado” (Kartullis, 1886, apud Cunha & Ferrari, 1994). Em 1891, Councilman & Lafleur fizeram um estudo detalhado do quadro clínico de 15 pacientes com amebíase intestinal e hepática. Foram os primeiros autores a empregar a denominação de disenteria amebiana e abscesso

hepático amebiano e também a sugerir a denominação *Amoeba dysenteriae* para o parasito (Councilman & Lafleur, 1891, apud Cunha & Ferrari, 1994). Em 1896, Farjado, no Brasil, estudou casos de colite amebiana humana, conseguindo reproduzir experimentalmente a enfermidade em gatos (Farjoado, 1896, apud Cunha & Ferrari, 1994). Em 1903, Schaudinn reconheceu a existência de duas espécies de amebas no intestino humano: uma patogênica, a *E. histolytica* e outra não patogênica, a *Entamoeba coli* (Schaudinn, 1903, apud Jackson, 1998). Em 1913, Walker & Sellards confirmaram a hipótese de Schaudinn ao obter experimentalmente a disenteria amebiana em voluntários humanos. Dobell, em 1911, estabeleceu o gênero das amebas que parasitam o homem, com descrições morfológicas e biológicas bastante precisas (Dobell, 1919, apud Clark, 1998). Seis anos depois, em 1925, Emile Brumpt propôs, com base no aspecto clínico-epidemiológico, a existência de duas espécies de amebas morfológicamente idênticas, porém biologicamente diferentes, habitando o intestino humano, sendo que, uma era considerada a espécie patogênica (*E. histolytica*) e a outra postulada como a espécie não patogênica (*E. dispar*). Neste mesmo ano, Boeck & Drbohlav cultivaram pela primeira vez a *E. histolytica* possibilitando assim novos estudos sobre o parasito. Entretanto, maiores avanços foram obtidos a partir do desenvolvimento do cultivo axênico por Diamond, em 1961. Martinez-Palomo & González-Robles (1973) demonstraram que as cepas patogênicas de *E. histolytica* aglutinavam na presença de uma lectina, a concavalina A, formando um grande aglomerado, ao passo que outras espécies de *Entamoeba* não patogênicas apresentavam capacidade limitada de aglutinação. Em 1989, Garfinkel et al. obtiveram sondas que hibridizavam seletivamente com isolados de zimodemos de cepas patogênicas (sonda P 145) e não patogênicas (sonda B 133). Em 1990, Petri et al. estudaram a subunidade de 170 kDa de uma lectina galactose específica envolvida na aderência de trofozoítos a células de linhagem intestinal *in vitro*. Os

autores obtiveram anticorpos monoclonais para diferentes epítomos desta lectina, permitindo a distinção laboratorial da infecção causada pelas espécies pertencentes ao complexo *E. histolytica*/*E. dispar*. Em 1991, Clark & Diamond encontraram perfis de restrição diferentes entre os genes ribossomais de alguns isolados e mostraram que os iniciadores específicos para rDNA de cepas patogênicas não amplificavam genes de cepas não patogênicas (Clark & Diamond, 1991). De 1988 a 1998, algumas pesquisas demonstraram diferenças antigênicas e bioquímicas entre a *E. histolytica* e a *E. dispar* (Tannich et al., 1989; Clark, 1998, Clark & Diamond, 1991; Sargeant, 1992). Com base nestas diferenças, Diamond & Clark, em 1993, defenderam a hipótese da existência de duas espécies de amebas morfologicamente semelhantes, a *E. histolytica* (patogênica) e a *E. dispar* (não patogênica).

De acordo com a sugestão de Sargeant (1992) e a redescrição de Diamond & Clark (1993), a Organização Mundial de Saúde (OMS) e os pesquisadores presentes no Seminário sobre Amebíase, realizado no México em 1997, concluíram que a *E. histolytica* e a *E. dispar* eram duas espécies morfologicamente idênticas através da microscopia óptica e que formavam um complexo denominado *E. histolytica*/*E. dispar* (WHO, 1997).

1.1.2 O Parasito

A *E. histolytica* pertence à Família Endamoebidae, Filo Sarcomastigophora, Subfilo Sarcodina, Superclasse Rhizopoda, Classe Lobosea, Subclasse Gymnamoebia,

Ordem Amoebida, Subordem Tubulina (Levine et al., 1980). Os protozoários desta classe são organismos que se movem e incorporam alimentos através de pseudópodes.

Os amebídeos compreendem um grupo homogêneo, que originou-se da convergência de formas muito distintas, as quais, sendo primitivamente flageladas e autotróficas, teriam perdido seus plastos e flagelos e desenvolvido atividade amebóide (Vancova et al., 2003). As amebas que parasitam o homem são caracterizadas por apresentar pseudópodes do tipo lobópode: grossos, arredondados na extremidade e não anastomosados entre si. São parasitos do aparelho digestivo ou dos tecidos de vertebrados, possuem pequenas dimensões, geralmente são desprovidas de vacúolos pulsáteis e formam cistos uni ou pluricelulares.

Os trofozoitos da *E. histolytica* são altamente móveis, apresentando um extenso pleomorfismo em sua superfície, medem entre 12 e 60 μm de diâmetro (em média pouco mais de 20 μm) (Figura 1). Sua fonte de energia é proveniente da conversão anaeróbica da glicose e piruvato à etanol (Reeves, 1984). Por não possuírem mitocôndrias, muitas de suas enzimas metabólicas parecem ser de origem procariótica, possivelmente adquiridas a partir de transferências laterais de genes bacterianos (Yang et al., 1994; Clark & Roger, 1995; Rosenthal et al., 1997). Em preparações realizadas com fezes frescas, as amebas movem-se por meio de pseudópodes, protruções que podem formar-se em qualquer ponto da superfície do protozoário e o núcleo não é visível. O pseudópode é rapidamente estendido e sua forma pode variar de curta, arredondada e larga, a longa e digitiforme. O ectoplasma claro e hialino forma a camada mais externa do corpo da ameba e flui para fora para formar o pseudópode. O endoplasma, mais granuloso, flui lentamente para dentro do pseudópode à medida que a ameba move-se na direção em que este foi estendido. A motilidade é usualmente progressiva e direcional, e não aparentemente sem rumo, como a

das outras amebas intestinais (Markell et al., 2003). Eritrócitos recentemente ingeridos aparecem como corpos refringentes (brilhantes), de cor esverdeada muito pálida (Markell et al., 2003). Bactérias também podem ser visualizadas em seu citoplasma. Os trofozoítos em degeneração apresentam rápida formação de vacúolos citoplasmáticos – com aparência de “queijo suíço”, facilmente identificados através da microscopia óptica.

As amebas pertencentes ao gênero *Entamoeba* caracterizam-se por possuir um núcleo esférico e vesiculoso, com uma membrana nuclear delicada, mas distinta. Em sua superfície interna vê-se um número variável de cromatina periférica, distribuída de forma homogênea. No centro do núcleo há uma pequena massa de cromatina, denominada cariossoma central. Entre o cariossoma e a cromatina periférica observa-se, por vezes, fibrilas palidamente coradas da rede de linina (Markell et al., 2003). Quando corado com hematoxilina, o citoplasma da ameba é acinzentado, as estruturas nucleares são preto-azuladas e os glóbulos vermelhos recentemente ingeridos coram-se de maneira semelhante a estas últimas; a cor dos eritrócitos é progressivamente mais pálida quanto mais digeridos estiverem. Com coloração tricrômica, o citoplasma é tipicamente verde, as estruturas nucleares são vermelho-escuras e os eritrócitos recentemente ingeridos podem ter a cor vermelho-cereja ou verde; o citoplasma das amebas coradas com coloração tricrômica é ocasionalmente róseo claro, e algumas vezes formas coradas em verde alternam-se com outras coradas em rosa da mesma preparação.

Preparando-se para a fase resistente de cisto, os trofozoítos expulsam todo o material ingerido e assumem uma forma arredondada. Esta fase, conhecida como fase pré-cística, caracteriza-se por um único núcleo redondo, ausência de material ingerido e falta de uma parede cística. Nesta fase a morfologia nuclear é confusa, sendo melhor utilizar trofozoítos ou cistos para identificação específica (Markell et al., 2003).

Os cistos podem ser reconhecidos, em preparações coradas pelo lugol, por sua parede hialínica refringente. São geralmente esféricos, mas podem ter forma ovóide ou irregular, variam aproximadamente de 10 a 20 μm de diâmetro e contêm de um a quatro núcleos. O citoplasma do cisto torna-se verde-amarelado com presença de vacúolos de glicogênio que se coram de castanho-amarelado; a membrana nuclear e o cariossoma são ligeiramente visíveis e coram-se de castanho-clara. Os corpos cromatóides, compostos de ácido ribonucléico, coram-se pela hematoxilina e podem ser visualizados como áreas claras, em forma de bastão ou charuto no citoplasma. São encontrados mais freqüentemente em cistos mono ou binucleados, e não são vistos em uma grande proporção dos cistos tetranucleados maduros (Markell et al., 2003). Quando corados pela hematoxilina ou coloração tricrômica, a estrutura nuclear é semelhante àquela observada nos trofozoítos. O anel periférico de cromatina pode aparecer mais espesso e menos uniforme em tamanho (Figura 2). Algumas cepas de *E. histolytica* apresentam constantemente cariossomas excêntricos e, em algumas, a cromatina periférica, ao invés de apresentar-se como uma camada de grânulos esféricos, forma placas finas sobre a membrana nuclear. Uma terceira variante da estrutura nuclear é a concentração periférica de cromatina em forma de crescente em um lado da membrana nuclear (Markell et al., 2003).

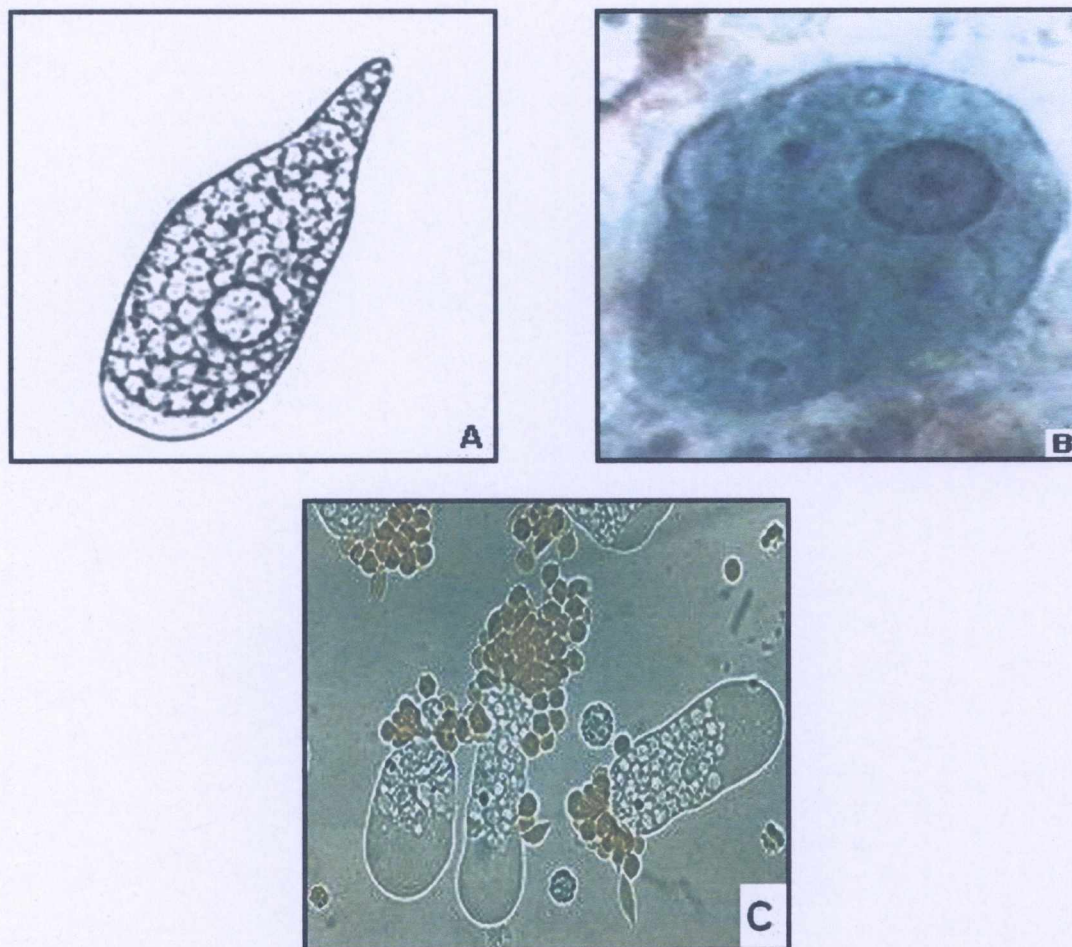


Figura 1. Trofozoítos de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*. Figura A, representação esquemática de um trofozoíto característico da espécie. Observar o núcleo: cariossoma central; cromatina regularmente distribuída na periferia do núcleo; fibrilas de linina (linhas que ligam a cromatina ao cariossoma). Figura B, trofozoíto corado pela técnica de tricrômico mostrando aspectos nucleares típicos desta espécie. Figura C, trofozoíto em cultura axênica não corado, contendo eritrócitos ingeridos. Adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Amebiasis.htm> em 30/08/2006).

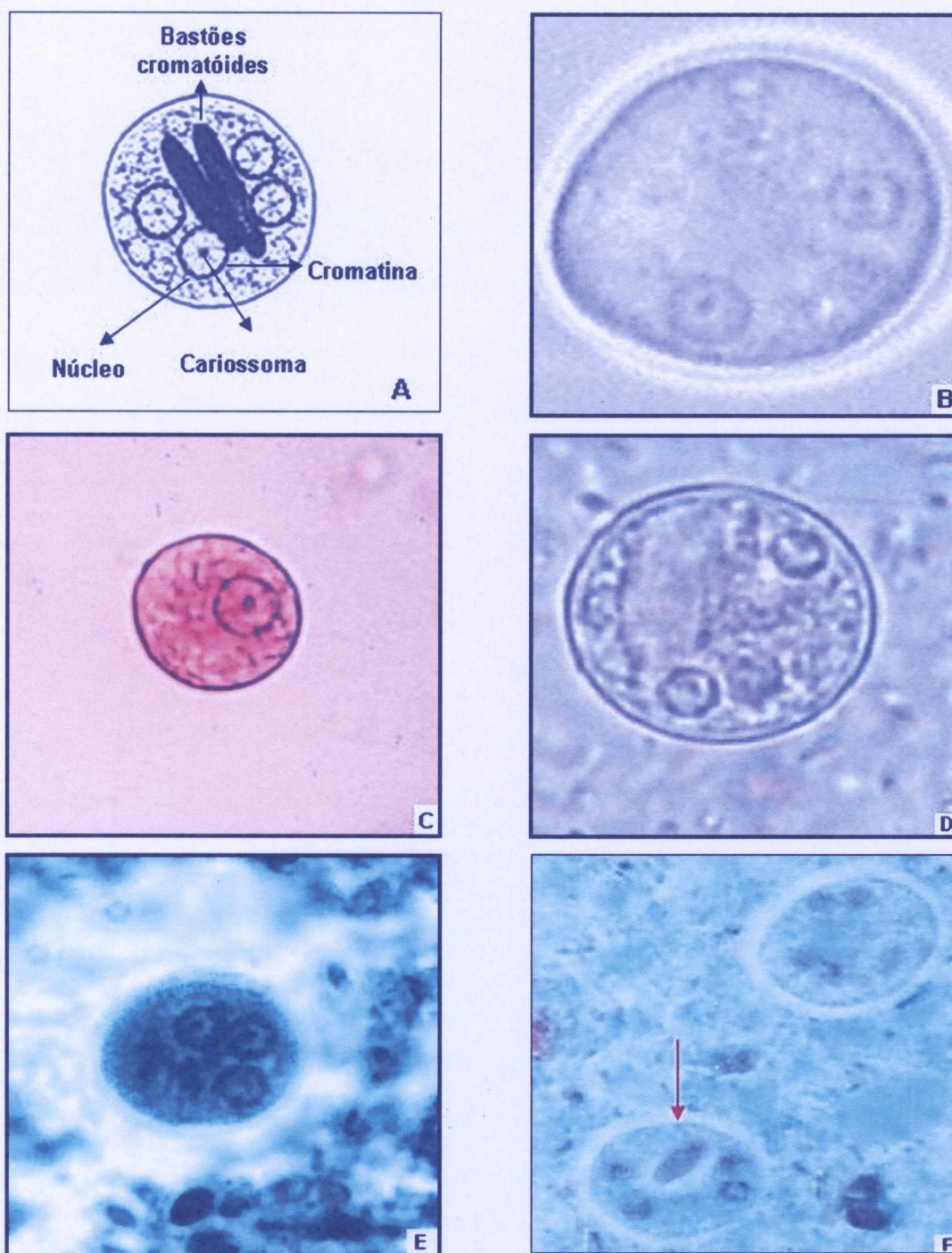


Figura 2. Cistos de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*. Figura A, desenho de um cisto típico da espécie. Observar núcleos, cariossoma central, cromatina regularmente distribuída na periferia do núcleo, fibrilas de linina, presença de bastões cromatóides e citoplasma granuloso. Figura B, cisto não corado, com refringência da parede cística, núcleos pouco visíveis. Figura C, cisto mononucleado corado pelo iodo. Figura D, cisto trinucleado corado pelo iodo. O espaço claro é representado pelos corpos cromatóides não corados. Figura E, cisto trinucleado corado pela hematoxilina férrica. Observar a presença dos bastões cromatóides (seta vermelha). Figura F, cistos corados pelo tricrômico. (Adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Amebiasis.htm> em 25/07/2006).

1.1.3 *Entamoeba histolytica* X *Entamoeba dispar*

Em 1925, Emile Brumpt sugeriu que a amebíase fosse constituída por duas espécies, a *Entamoeba dispar*, um organismo comensal, e a *Entamoeba dysenteriae*, um organismo patogênico. Em 1978, Sargeant e Williams identificaram diferenças entre isolados de indivíduos assintomáticos e de indivíduos portadores de amebíase através de análises isoenzimáticas. Posteriormente foi possível comprovar as diferenças existentes entre as duas espécies através de seqüenciamento gênico (Tannich et al., 1989; Burch et al., 1991; Clark & Diamond, 1991).

A *Entamoeba dispar* é um organismo morfológicamente idêntico a *E. histolytica*, é capaz de causar lesões intestinais focais em animais de laboratório, como gatos, gerbilos e cobaias (Markell et al., 2003). No homem vive como um comensal estável e avirulento produzindo um estado de portador assintomático, sendo aproximadamente nove a dez vezes mais prevalente que a *E. histolytica* (Allanson-Jones et al., 1986; Reed et al., 1991).

Uma diferença marcante entre as espécies pertencentes ao complexo é a capacidade de síntese de moléculas de virulência pela *E. histolytica*, que o faz em concentrações de 10 a 1000 vezes mais do que a *E. dispar* como, por exemplo, as cisteína proteinases (Leippe et al., 1995; Stanley et al., 1995) e outras (Kretschmer et al., 1985).

O grande impacto na redescrição da espécie ocorreu devido aos estudos epidemiológicos, empregando como ferramentas a biologia molecular e diagnóstico através da pesquisa de coproantígenos.

1.1.4 Patogenia

1.1.4.1 Moléculas de virulência

A patogenia da amebíase está diretamente relacionada à capacidade de síntese e secreção de moléculas responsáveis pela virulência dos trofozoítos. Faz parte destas moléculas a família das amebaporos que é composta pelas isoformas A, B e C isoladas como peptídeos biologicamente ativos a partir do citoplasma granular de cepas patogênicas, na proporção de 35:10:1, respectivamente (Leippe et al., 1994). Estas moléculas são capazes de penetrar na superfície hidrofóbica da membrana plasmática das células-alvo enquanto, simultaneamente, expõem o lado polar da cadeia para a água, graças ao seu arranjo de α -hélices anfipáticas. Os monómeros tendem a oligomerizar-se como moléculas de alta massa molecular, num processo dirigido por interação peptídeo-peptídeo, formando um canal preenchido por água, através do qual íons e outras moléculas passam livremente resultando em lise osmótica (Ojcius & Young, 1991; Leippe et al., 1992).

Outro grupo de moléculas são as lectinas de superfície dos trofozoítos que reconhecem especificamente os oligossacarídeos N- e O-ligados, como a galactose (Gal) e a N-acetil-D-galactosamina (GalNAc), presentes na superfície das células-alvo, incluindo neutrófilos e macrófagos, assim como às células colônicas que revestem o epitélio intestinal, principais alvos do efeito citolítico da *E. histolytica* (Ravdin et al., 1985; Chadee et al., 1987). Após contato entre as moléculas de lectinas e os oligossacarídeos ocorre uma

mudança conformacional da subunidade maior da lectina, disparando uma cascata de transdução de sinal responsável pela citólise da célula-alvo (Calalb et al., 1995; Laflamme & Auer, 1996). Além desta função, as lectinas protegem os trofozoítos do ataque do sistema complemento, devido a sua similaridade funcional com a proteína regulatória do complemento, a CD59, a qual liga-se às subunidades C8 e C9 do complexo C5b-9 (Rollins et al., 1991).

Além das moléculas de virulência citadas acima, a função das cisteína proteinases na invasão tecidual é comprovada pela sua habilidade de clivar as estruturas que compõem a matriz extracelular (colágeno, laminina e fibronectina) (Que & Reed, 2000). Alguns estudos de microscopia eletrônica demonstraram que após a adesão dos trofozoítos na superfície apical de células polarizadas ocorre uma diminuição na resistência do epitélio, devido à uma modificação da integridade morfológica da camada lipídica e das proteínas que compõem as junções celulares. É possível observar o desprendimento da célula epitelial colônica após contato com os trofozoítos, sugerindo que a degradação da membrana basal seja um importante passo na invasão tecidual (Li et al., 1994; Que & Reed 1997; Leroy et al., 2000). Além disso, moléculas de cisteína proteinase são capazes de degradar tanto imunoglobulinas da classe A humanas, presentes nas mucosas, como moléculas de IgG, através de clivagem de sua cadeia pesada (Kelsall & Ravdin, 1993; Que & Reed, 1997). Assim, as proteinases não agem somente na degradação das barreiras naturais do hospedeiro como a fibronectina, colágeno e laminina, mas também exercem forte influência na imunidade específica através da clivagem de determinados isotipos de anticorpos.

1.1.4.2 Amebíase intestinal

A colite amebiana caracteriza-se pela presença de úlceras discretas, separadas por regiões de mucosa colônica de aparência normal. A invasão tecidual é iniciada pelo reconhecimento das moléculas do epitélio intestinal pelo parasito. Dessa forma, no processo de adesão celular há formação de um espaço intercelular, denominado foco de adesão, onde ocorre a secreção de proteínas necessárias para a invasão tecidual. Além das proteínas mais importantes relacionadas à invasão tecidual, como as cisteína proteinases e as lectinas específicas, a proteína quinase C exerce importante função, tanto no processo de citólise quanto na adesão trofozoítica à superfície celular, favorecendo a liberação de uma maior quantidade de cisteína proteinase no foco de adesão e maior dano à célula-alvo, onde desenvolve uma rápida resposta inflamatória aguda, com presença de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, podendo ocasionar ulcerações profundas em forma de frasco com pescoço estreito e uma base ampla. À medida que a lesão progride, a superfície mucosa subjacente é privada de seu fluxo sanguíneo sendo, por fim, necrosada, com perfuração da parede intestinal e conseqüente infecção sistêmica.

No início da invasão tecidual a imunidade inata do hospedeiro exerce um importante papel na resolução da colite amebiana. Os enterócitos reconhecem moléculas antigênicas de padrões moleculares associadas ao patógeno (PAMPs), que nas amebas são formadas por lectinas específicas, moléculas de serina proteinase e moléculas ricas em lipofosfoglicanos (LPGs) e lipofosfopeptideoglicanos (LPPGs) (Prasad et al., 1992; Srivastava et al., 1995; Moody et al., 1997; 2000; Bhattacharya et al., 2000; Moody-Haupt et al., 2000). Os polimorfismos na estrutura destas moléculas determinam a

heterogeneidade no perfil patogênico da *E. histolytica*, definindo cepas como patogênicas ou não. Assim, a patogenicidade de uma cepa depende da capacidade do reconhecimento das PAMPs pelos *toll-like receptors* (TLRs) nas células epiteliais (Campos-Rodríguez & Jarillo-Luna, 2005). Mudanças estruturais nas moléculas de LPG e LPPG na superfície dos parasitos formam novas PAMPs, que podem não ser reconhecidas pelas células da resposta imune e inflamatória.

Após o reconhecimento das PAMPs pelos TLRs ocorre ativação intracelular e liberação de citocinas pro-inflamatórias e fatores solúveis, como as interleucinas 1, 6 e 8 (IL-1, IL-6 e IL-8) fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator estimulador de granulócitos e macrófago (GM-CSF) (McGee, 1999). Neutrófilos são rapidamente recrutados e ativados em resposta a estes fatores e são lisados pelos trofozoítos, com liberação de mediadores químicos provenientes de seus grânulos citoplasmáticos, podendo resultar em dano tecidual e necrose (Seydel et al., 1997; Stenson et al., 2001). Através da microscopia óptica, visualiza-se no tecido necrosado um exsudato composto por material protéico amorfo, células vermelhas e faixas de fibrina, formando uma zona de necrose liquefativa. Também pode ser observado um intenso infiltrado neutrofílico com presença de alguns linfócitos e macrófagos e raros eosinófilos. A escassez de macrófagos na lesão ocorre em virtude da secreção do fator de inibição de locomoção monocitária (MLIF) produzido por diversas cepas de *E. histolytica*, independentemente de sua virulência (Kretschmer et al., 1985). Esta molécula é um pequeno peptídeo amebiano capaz de inibir a quimiotaxia de fagócitos mononucleares, mas não de polimorfonucleares (Kretschmer et al., 2001). Além disso, o MLIF também é capaz de inibir a síntese de compostos nitrogenados e oxigenados (Rico et al., 1992, 2000).

Ao final da doença, ocorre a formação de tecido granulomatoso, caracterizado pela formação de novos vasos (angiogênese), indicando a cura da lesão. Não se sabe se este processo de reparo ocorre espontaneamente ou é secundário à quimioterapia anti-amebiana. Tratamento adequado, nos casos de amebíase invasiva, cura a lesão sem a formação de tecido de cicatrização. Os mecanismos deste processo de reparo ainda não são completamente entendidos.

Estudos *in vitro* demonstraram que os trofozoítos de *E. histolytica* exercem potente atividade citolítica em leucócitos polimorfonucleares e células mononucleares do sangue periférico (Salata et al., 1985). No curso da infecção, há uma supressão da função efetora dos macrófagos, a qual é gradualmente recuperada após terapia anti-amebiana (Ortiz-Ortiz et al., 1975; Salata et al., 1990). Macrófagos isolados de abscessos hepáticos são refratários à ativação por IFN- γ e lipopolissacarídeos (LPS) e são, também, defectivos na produção de H₂O₂, IL-1 e TNF- α , sugerindo uma supressão das funções destas células no sítio da infecção (Denis & Chadee, 1988; Wang et al., 1992; 1994). Entretanto, outras populações de macrófagos distantes deste sítio permanecem imunologicamente funcionantes. Estudos *in vitro* demonstraram que macrófagos *naïve*, derivados de medula óssea de camundongos BALB/c, quando expostos às proteínas antigênicas da *E. histolytica*, aumentam a expressão de RNAm para TNF- α . No entanto, não há formação de TNF- α ativo (Séguin et al., 1995).

A anergia dos macrófagos no sítio de infecção pode estar relacionada à síntese de prostaglandina E2 (PGE2), que atua inibindo a produção de IL-1 e TNF- α e a expressão de MHC-II (Phipps et al., 1991). Em modelos animais foi demonstrado que macrófagos derivados de lesões amebianas produzem altos níveis de PGE2 (Wang & Chadee, 1992).

Além disso, macrófagos *naïve* do peritônio e medula óssea, após incubação com proteínas de *E. histolytica*, secretam PGE2 (Wang & Chadee, 1992; 1995).

A resposta inflamatória produz lesão epitelial alterando o funcionamento da absorção alimentar. Mesmo quando não há danos macro ou microscópicos, há evidências de que esta resposta leva às crises diarréicas devido à liberação dos mediadores químicos como a histamina, prostaglandinas, leucotrienos, cinninas e citocinas pró-inflamatórias induzindo alterações intestinais (Beubler et al., 1989, 2002). A histamina ativa as vias secretórias agindo diretamente nos receptores H1, presentes na superfície dos enterócitos. As bradicininas atuam de modo indireto através do estímulo à secreção dos metabólitos do ácido araquidônico, como as prostaglandinas e leucotrienos de linfócitos e outras células do sistema imune, localizadas nas adjacências da lesão. As prostaglandinas E2 e F2 atuam em receptores presentes na membrana basolateral dos enterócitos, resultando na ativação da enzima adenilato ciclase e, conseqüentemente, aumentando o influxo de eletrólitos para o lúmen intestinal, provocando diarréia. O bloqueio da síntese de prostaglandinas por inibidores da cicloxigenase (indometacin) re-estabelece a absorção intestinal, diminuindo ou cessando as crises diarréicas (Argenzio et al., 1993).

Quando os trofozoítos atingem a circulação sangüínea anticorpos específicos ligam-se ao parasito. No entanto, estes possuem a habilidade de concentrar ou agregar os anticorpos em regiões específicas da membrana plasmática, denominadas uróides (estruturas caracterizadas morfológicamente por dobras na membrana plasmática das amebas). Forças contráteis, geradas nesta região, propiciam o desprendimento dos uróides da superfície do parasito (Tavares et al., 2000). Este fato deve-se ao transporte ativo realizado pelas moléculas de actina, miosina e proteínas associadas à actina que direcionam

os agregados para os uróides. Dessa forma, os trofozoítos não são destruídos pelo mecanismo de citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC).

1.1.4.3 Amebíase extra-intestinal

A depender do perfil genético, imunoenzimático, da habilidade em sintetizar enzimas proteolíticas e capacidade de evasão do sistema complemento, os trofozoítos podem penetrar em pequenas veias, presentes na submucosa intestinal, e disseminar-se através da circulação porta, atingindo preferencialmente o tecido hepático. Os mecanismos fisiopatogênicos pelos quais os trofozoítos provocam lesões hepáticas e em outros órgãos são semelhantes àqueles vistos na colite amebiana. A inflamação tecidual e a lise de neutrófilos mediada pelos trofozoítos liberam uma série de mediadores químicos responsáveis pela amplificação da lesão inicial, ocasionando a morte celular. No fígado, com a evolução do processo inflamatório, as úlceras focais podem coalescer desenvolvendo uma lesão hepática extensa, denominada abscesso hepático, constituído por um material espesso, homogêneo, acastanhado e estéril (Adams & MacLeod, 1977b, Salles et al., 2003).

As lesões hepáticas são usualmente únicas ou solitárias, mais frequentemente localizadas no lóbulo direito, continuamente à cápsula hepática. São variáveis em tamanho, em alguns casos podem ocupar mais que 80% de toda a superfície hepática. Este fato pode ser explicado pelo elevado tamanho do lóbulo direito, o qual recebe um grande influxo de drenagem venosa advinda do cólon direito, segmento do intestino frequentemente afetado

pela amebíase intestinal (Kapoor, 1990). As lesões amebianas do lobo esquerdo são menos comuns e múltiplos abscessos podem ocorrer em casos avançados de amebíase.

1.1.5 Epidemiologia

A *Entamoeba histolytica* possui distribuição cosmopolita e representa um risco à saúde nos países onde as barreiras sanitárias são inadequadas (Ravdin, 1995). Estima-se que 500 milhões de indivíduos em todo o mundo estejam infectados pelo complexo *E. histolytica/E. dispar*, havendo entre 40.000 a 100.000 óbitos anuais em decorrência da amebíase, tornando esta doença a segunda causa de morte entre as doenças parasitárias (Walsh, 1988). Em 1996, foi registrado cerca de 1.3 milhão de casos de amebíase no México e, embora possa ter existido indivíduos infectados por *E. dispar*, este dado está de acordo com estudos sorológicos realizados naquele país, que indicam que mais de 8% da população tenha amebíase (Caballero-Salcedo et al., 1994; Díaz et al., 2003). No Vietnã, um estudo realizado no hospital municipal de Hue, cidade com uma população de 1 milhão de habitantes, foram observados 1500 casos de abscesso hepático amebiano, diagnosticados em um período de 5 anos (Pham et al., 1996). No Egito, uma pesquisa apontou que 38% dos indivíduos, atendidos em um ambulatório de emergência, que apresentavam diarreia aguda, evoluíram para uma colite amebiana (Abd-Alla & Ravdin, 2002). Nos Estados Unidos, muitos casos de amebíase ocorrem em imigrantes oriundos de áreas endêmicas e em indivíduos residentes em estados que fazem fronteira com o México. Em 1993, 2970 casos de amebíase foram relatados nos Estados Unidos, dos quais 33% em

imigrantes procedentes do México e das Américas Central e do Sul (SNDUS, 1994). Indivíduos residentes em países de baixa endemicidade quando viajam para áreas de média ou alta endemicidade são considerados grupo de risco para a infecção. Segundo Jelinek et al. (1996), 0.3% dos alemães que viajam para áreas endêmicas retomam ao seu país de origem infectados pela *E. histolytica*.

No Brasil, a amebíase também constitui um sério problema de Saúde Pública, apresentando maior prevalência em populações de nível sócio-econômico mais baixo e condições precárias de saneamento básico, resultado em altos índices de morbidade (Ferreira et al., 1997; Santos et al., 2005). Na região Amazônica, estudos realizados através da pesquisa de coproantígenos relataram a ocorrência tanto da *E. histolytica* quanto da *E. dispar*, com maior prevalência da primeira (Nozaki et al., 1990). No entanto, em Manaus (AM), a prevalência da *E. histolytica* (6.8%) é menor do que aquela observada para a *E. dispar* (14.7%) (Benetton et al., 2005). Em Fortaleza, Braga et al. (2001) encontraram índices de positividade de 14.9% para *E. histolytica* e 10.6% para *E. dispar*, em indivíduos de baixa renda. De acordo com os dados relatados por Silva et al. (2005) a prevalência da infecção causada pela *E. histolytica* em indivíduos residentes na região metropolitana de Belém (PA) é de 29.35%. Os estudos realizados no estado de Pernambuco e na cidade de Belo Horizonte (MG) demonstraram que a ocorrência da *E. histolytica* é rara, prevalecendo a *E. dispar* (Dourado et al., 2006; Oliveira-Costa et al., 2006). Em Salvador (BA) não existe nenhum estudo epidemiológico para diferenciação das espécies pertencentes ao complexo *E. histolytica/E. dispar*.

A colite amebiana é uma doença que afeta adultos e crianças de ambos os sexos, com maior prevalência para indivíduos do sexo masculino (Acuna-Soto et al., 2000). Já os abscessos hepáticos afetam predominantemente homens entre 18 e 50 anos (Debakey

& Ochsner, 1951; Abuabara et al., 1982; Katzenstein et al., 1982; Thompson, et al., 1985; Barnes et al., 1987; Shandera et al., 1998; Acuna-Soto et al., 2000). De fato, a palavra de origem Zulu para esta doença é *isigwebedhla*, a qual significa homem jovem e forte (Elsdon-Dew, 1968; Shandera et al., 1998). A razão para esta diferença ainda é desconhecida. Mulheres menopausadas são mais susceptíveis à formação de abscessos hepáticos causados pela *E. histolytica*, podendo os fatores hormonais estarem contribuindo para a infecção (Elsdon-Dew, 1968). Alguns autores também sugerem o consumo de álcool como fator de risco (Elsdon-Dew, 1968; Katzenstein et al., 1982; Shandera et al., 1998). Recentemente, foi sugerido que o desenvolvimento de abscesso hepático está correlacionado à indivíduos portadores do HLA-DR3. Esta associação não tem sido observada em indivíduos com colite amebiana e nos assintomáticos (Arellano et al., 1992; 1996; Valdéz et al., 1999).

Indivíduos com amebíase são infectados por ingestão de alimentos ou água contaminada com fezes contendo cistos de *E. histolytica* (Ashbolt, 2004). Entretanto, modos não usuais de transmissão, incluindo sexo oral e anal e contaminação por espécies já foram descritos na literatura (Istre et al., 1982). Alguns autores demonstraram que a infecção causada pelo sexo oral é comum entre homossexuais masculinos residentes em áreas urbanas dos Estados Unidos (Schmerin et al., 1977; Markell et al., 1984; Allason-Jones et al., 1986; Reed et al., 1991; Lowther et al., 2000). Alguns surtos de amebíase têm sido registrados ao longo dos anos. Em Chicago, no ano de 1933, foram diagnosticados 800 casos da infecção, veiculados através da contaminação do reservatório de água potável com dejetos fecais (Bundesen et al., 1934). Mais recentemente, em Tbilisi, capital da Geórgia, foi registrado um surto com 1377 casos de amebíase intestinal e 365 casos de abscessos hepáticos (Kreidl et al., 1999).

Em clínicas para doentes mentais, a infecção causada pela *E. histolytica* é bastante freqüente. Estudos epidemiológicos realizados nos Estados Unidos (Sexton et al., 1974; Braun et al., 1988), Inglaterra (Sargeant & Williams, 1982), França (Chaker et al., 1981), Itália (Gatti et al., 1995) e Japão (Nagarura et al., 1989; 1990) apontaram taxas de positividade que variam entre 7 a 30%. Tachibana et al. (2000) observaram alto grau de infecção entre os internos de várias clínicas do Japão, embora a quantidade de casos de colite amebiana e abscesso hepático tenha sido limitada.

Outra forma de transmissão da amebíase é através da veiculação de cistos por insetos. Algumas espécies de baratas (*Periplaneta americana* e *Blattella germanica*) são capazes de carrear cistos tanto em seu conteúdo intestinal quanto na cutícula (Pai et al., 2003). Outros animais já foram descritos como transmissores da *E. histolytica* como, por exemplo, primatas não humanos (Rivera & Kanbara, 1999; Verweij et al., 2003), tatus da espécie *Euphractus sexcinctus* (Soares et al., 2000) e tamanduás da espécie *Tamandua teradactyla* (Diniz et al., 1995).

O aleitamento materno, atuando na proteção passiva dos recém-nascidos, pode influenciar na epidemiologia desta parasitose. Estudos mostraram que a incidência de amebíase é menor em crianças que foram amamentadas. Este efeito protetor é atribuído às propriedades anti-infecciosas e anti-inflamatórias do leite materno, que contém grandes quantidades de imunoglobulinas, principalmente do isotipo A (IgA) (Xanthou et al., 1995; Chierici, 2003; Akisu et al., 2004).

1.1.6 Sinais e Sintomas

O intervalo que decorre desde a ingestão de cistos de *E. histolytica* e aparecimento dos sintomas pode variar desde alguns dias até anos, de modo que não é possível, na maioria dos casos, definir o período de incubação. No entanto, a maioria dos indivíduos infectados pela *E. histolytica* não desenvolve sintomas, permanecendo assintomática durante todo o curso da infecção (Haque et al., 1998; 1999; Gathiram & Jackson, 1987; Jackson et al., 1985). Este fato deve-se a existência de cepas polimórficas, diferindo no grau de patogenicidade, e a fatores relacionados ao hospedeiro, tornando-o ou não susceptível à infecção. De acordo com Campos-Rodríguez & Jarillo-Luna (2005), a resposta imune inata é o fator mais importante no controle da infecção, para evitar a invasão tecidual e, conseqüentemente, provocar um estado de portador assintomático.

Um dos sintomas mais freqüentes na amebíase intestinal é a colite amebiana aguda, na qual o indivíduo apresenta intensas dores abdominais e as fezes contêm muito muco e sangue, geralmente permanecendo neste estado por um ou dois dias. Também podem ocorrer náuseas e vômitos, assim como mal-estar e cefaléia. Em seguida, os indivíduos infectados passam a apresentar múltiplas evacuações mucóides e de pequeno volume, podendo-se observar diarréia aquosa profusa com presença de sangue, dor abdominal, perda de peso, anorexia e febre em 40% dos casos (Lewis & Antia, 1969; Adams & MacLeod, 1977a). A invasão da mucosa colônica pelos trofozoítos pode levar à hemorragia macroscópica e pode ser detectada também em crianças sem histórico de diarréia (Adams & MacLeod, 1977a; Merritt et al., 1982; Jammal et al., 1985). Ocasionalmente a colite amebiana evolui para perfuração da parede intestinal, podendo

apresentar íleo paralítico e deslocamento da mucosa resultante da formação de úlceras extensas, caracterizando-se como um quadro de colite fulminante (Bank et al., 1971; Cardoso et al., 1977; Jammal et al., 1985; Ellyson et al., 1986; Aristizabal et al., 1991; Takahashi et al. 1997). Pacientes imunossuprimidos e gestantes formam um grupo de risco para o desenvolvimento da doença fulminante. Além destas situações, alguns autores também destacam o diabetes melitus e uso crônico de álcool como fatores de risco (Abioye, 1973; Takahashi et al., 1997).

Geralmente, a disenteria amebiana aguda cessa no início da doença, seguindo um período de quiescência ou latência, usualmente caracterizado por constipação alternada por diarreia, com fezes contendo muco e sangue. Este estado pode persistir durante semanas e meses e é geralmente denominado colite amebiana subaguda, podendo reativar a fase aguda, com sintomas semelhantes aos iniciais descritos anteriormente. Esta seqüência de acontecimentos constitui a forma crônica amebiana, que se processa, via de regra, após uma fase aguda, ou pode ser crônica desde o começo da infecção. Além disso, aparecem outros sintomas, como emagrecimento, inapetência, astenia, dores abdominais e flatulência (Markell et al., 2003).

Na amebíase hepática, os principais sintomas consistem em dor ou sensação de peso no hipocôndrio direito e rigidez dos músculos abdominais nesta mesma região. Em 25% dos casos, os pacientes apresentam diarreia, náuseas e vômitos e, por vezes, icterícia. Outros sinais e sintomas característicos são dor localizada à percussão hepática, febre baixa e inconstante e perda de peso (Stanley, 2003). Em casos graves, o indivíduo infectado pode apresentar necrose do tecido hepático e caqueixa, podendo evoluir para o óbito.

1.1.7 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da amebíase é presuntivo e os sinais e sintomas são inespecíficos, podendo ser confundidos com os de outras infecções intestinais. O diagnóstico laboratorial do complexo *E. histolytica*/*E. dispar* é realizado rotineiramente através da demonstração microscópica de cistos e/ou trofozoítos no sedimento fecal. Estas espécies apresentam características morfológicas semelhantes, sendo diferenciadas somente através de técnicas moleculares específicas. Um diagnóstico preciso é importante tanto para pacientes sintomáticos, como para os portadores assintomáticos devido à facilidade de transmissão através do contato pessoa-pessoa, especialmente em países subdesenvolvidos onde as condições de higiene são precárias (Santos et al., 2005).

O diagnóstico microscópico de preparações fecais coradas pelo lugol para pesquisa de cistos é a ferramenta mais usada no diagnóstico da amebíase. Sua execução é simples, barata e não exige equipamentos sofisticados. No entanto, é incapaz de diferenciar as espécies pertencentes ao complexo *E. histolytica*/*E. dispar*, tornando o seu diagnóstico presuntivo e invalidando sua utilização em estudos epidemiológicos específicos. Nos espécimes fecais a fresco, os trofozoítos são mais frequentemente observados com sua motilidade linear característica, com projeções hialinas do ectoplasma formando pseudópodes, os quais arrastam o endoplasma e seu núcleo (Proctor, 1991). Geralmente, observam-se eritrócitos no citoplasma de trofozoítos de *E. histolytica*. No entanto, trofozoítos de *E. dispar* eventualmente podem apresentar eritrócitos fagocitados (Haque et al., 1995). Experimentos *in vitro* demonstraram que a taxa de eritrofagocitose é significativamente maior nas espécies de *E. histolytica* do que em qualquer outra espécie de

ameba (Trissl et al., 1978). Nos casos de amebíase crônica é comum a ausência de eritrócitos fagocitados, sugerindo que a eritrofagocitose seja indicativa de infecção por cepas invasivas (González-Ruiz et al., 1994a). O diagnóstico através da pesquisa de trofozoítos ocorre somente em condições disentéricas e a demora no processamento do material fecal implica na redução da sensibilidade do teste, pois os mesmos permanecem viáveis por apenas 20 minutos após sua eliminação. Ocasionalmente, são vistos trofozoítos móveis em amostras fecais mantidas sob refrigeração durante um prazo de até quatro horas, apesar de se desintegrarem rapidamente em amostras não fixadas (Walsh, 1986; Proctor, 1991; Ravdin, 1995).

Nos exames de rotina laboratorial, além da espécie não ser identificada, outros fatores podem afetar os seus resultados como, por exemplo, atraso no processamento do material, analista mal treinado, dificuldade na diferenciação de trofozoítos não móveis de células epiteliais, uso de coletores contaminados, presença de substâncias interferentes como antibióticos, laxantes, antiácidos, antidiarréicos ou enemas, número inadequado de amostras fecais analisadas, preservação inadequada das amostras e liberação intermitente de cistos e/ou trofozoítos (Krogstad *et al.*, 1978; Walsh, 1986; Garcia & Bruckner, 1997).

Os meios de cultura podem ser utilizados para o diagnóstico da *E. histolytica*, no entanto são pouco utilizados na rotina laboratorial, uma vez que são de difícil execução, de alto custo, baixa sensibilidade (30%) e não diferenciam as espécies do complexo *E. histolytica/E. dispar*. Os cultivos axênicos destes organismos são de valor para estudos bioquímicos e imunológicos, produção de antígenos e anticorpos, estudos diferenciais entre cepas patogênicas e não-patogênicas (zimodemos), triagem de novos medicamentos *in vitro*, infecção de animais de laboratório como modelo experimental em estudos de patogenia e para o conhecimento da organização do parasito em nível ultra-estrutural.

A detecção de anticorpos é uma ferramenta que pode auxiliar no diagnóstico da infecção causada pela *E. histolytica*. No entanto, não distingue as infecções recentes das anteriores, devido à persistência de anticorpos circulantes (Gathiram & Jackson, 1987; Caballero-Salcedo et al., 1994). Em locais onde a infecção é incomum a pesquisa de anticorpos revela resultados mais fidedignos (Ohnishi & Murata, 1997; Walderich et al., 1997; Weinke et al., 1990). Anticorpos séricos anti-*E. histolytica* podem ser detectados em 75-80% dos pacientes com infecção sintomática e em até 100% dos casos de abscessos hepáticos (Zengzhu et al., 1999). Os métodos mais utilizados para esta finalidade incluem: ELISA (Braga et al., 1996; Pal et al., 1996), hemaglutinação indireta (Hung et al., 1999; Parija & Karki, 1999), contraímuno eletroforese (Restrepo et al., 1996), testes de difusão em gel (Jackson et al., 1984), fixação do complemento (Knobloch & Mannweiler, 1983; Lotter et al., 1993), imunofluorescência indireta (Tanyuksel et al., 1995; Tachibana et al., 2000) e aglutinação em partículas de látex (Cummins et al., 1994; Lotter et al., 1995). Os testes de ELISA, disponíveis no mercado, pesquisam a presença de anticorpos IgM ou IgG anti-lectinas (Gathiram & Jackson, 1987; Haque et al., 2000). No entanto, resultados falso-positivos podem ocorrer em virtude da colonização do lúmen intestinal pela *E. dispar* que também é capaz de estimular a secreção de anticorpos anti-lectinas (Jackson et al., 1985; Jetter et al., 1997).

Para a detecção de antígenos o teste de ELISA possui vantagens quando comparado a outras metodologias rotineiramente usadas no diagnóstico da amebíase. Alguns testes são capazes de diferenciar a infecção causada pela *E. histolytica* da colonização intestinal provocada pela *E. dispar*, podem ser utilizados para diagnóstico de várias amostras em uma única placa e possuem elevadas sensibilidade e especificidade (González-Ruiz et al., 1994b). Entretanto, esta metodologia é limitada para pesquisa de

antígenos em amostras fecais que sofrem sucessivos congelamentos ou preservadas pelo formol, pois os antígenos podem ser desnaturados durante estes processos. Na pesquisa de antígenos, além do material fecal, outras amostras podem ser usadas como, por exemplo, a saliva, soro e fluidos de abscessos hepáticos. Haque et al. (2000) diagnosticaram a maioria de seus pacientes utilizando ELISA capaz de detectar lectinas específicas de *E. histolytica* no fluido dos abscessos hepáticos. Abd-Alla et al. (2002) realizaram diagnóstico da amebíase hepática utilizando saliva de indivíduos portadores de abscessos hepáticos.

Outra alternativa para diferenciação das espécies pertencentes ao complexo *E. histolytica/E. dispar* é a reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta técnica reproduz a habilidade natural da replicação do DNA através da utilização de sondas ou iniciadores (*primers*). Na metodologia utiliza-se uma DNA polimerase, as bases nitrogenadas (dNTPs), um co-fator enzimático ($MgCl_2$) e os iniciadores da reação. Em seguida, a mistura é submetida a um ciclo composto por três etapas. A etapa 1 é denominada desnaturação por aquecimento; ocorre normalmente em temperaturas maiores que $90^{\circ}C$ e separa a dupla fita do DNA em duas fitas simples. Na etapa 2, de hibridização e ligação do iniciador ao alvo; ocorre o reconhecimento dos iniciadores à seqüência-alvo específica e posterior hibridização. Este processo ocorre normalmente entre $40^{\circ}C$ e $65^{\circ}C$, dependendo da extensão e da seqüência de base dos iniciadores, os quais se ligam à seqüência-alvo com alta especificidade. Na última etapa, a de extensão; a DNA polimerase inicia o processo de síntese na região delimitada pelos iniciadores. Ela sintetiza novas moléculas de DNA, de cadeia dupla, ambas idênticas à cadeia original, na região do DNA-alvo, facilitando a ligação e unindo os nucleotídeos complementares que estão livres em solução. Este processo é realizado em um termociclador, instrumento que controla e alterna

automaticamente as temperaturas em períodos programados de tempo, por um número determinado de ciclos de PCR (geralmente entre 30 e 40 ciclos). A cada ciclo a quantidade de DNA-alvo duplica. Este processo da PCR é também chamado amplificação, pois a seqüência-alvo é multiplicada milhões de vezes. O diagnóstico através da PCR possui boa reprodutibilidade, alta sensibilidade e especificidade e é capaz de detectar um único trofozoíto por mg de fezes. Em pacientes com eliminação de poucos cistos é uma alternativa para o diagnóstico, além de ser de menor custo do que a pesquisa de coproantígenos pela técnicas de ELISA (Katzwinkel-Wladarsch et al., 1994). A PCR tem sido utilizada com bastante freqüência em estudos epidemiológicos como uma ferramenta de escolha para o diagnóstico diferencial entre as espécies pertencentes ao complexo *E. histolytica/E. dispar* (Valle et al., 2000; Evangelopoulos et al., 2001; Roy et al., 2005).

1.1.8 Justificativa

Este estudo foi idealizado devido a necessidade de conhecer a epidemiologia da infecção causada pelas espécies pertencentes ao complexo *E. histolytica/E. dispar* no município de Salvador-BA, e direcionar a classe médica para a realização de um tratamento específico. Para tal, a reação em cadeia da polimerase foi implantada como ferramenta para diagnóstico diferencial entre as espécies.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Padronizar a reação em cadeia da polimerase (PCR) para diagnóstico da amebíase e determinar a prevalência da infecção em pacientes atendidos por laboratórios do sistema privado (Centro de Medicina Laboratorial e Laboratórios Dirceu Ferreira, Qualitech e Datalab) e público de saúde (laboratórios de Parasitologia da Faculdade de Farmácia - UFBA e do Hospital Universitário Professor Edgard Santos - HUPES/UFBA), de Salvador, Bahia, no período de 11/02/2006 a 20/08/2006.

2.2 Específicos

Padronizar a reação em cadeia da polimerase (PCR) para diagnóstico diferencial entre as espécies do complexo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*;

Comparar a especificidade da PCR com o ensaio imunoenzimático (ELISA), para o diagnóstico da *E. histolytica* em amostras de fezes humanas;

Determinar a prevalência da infecção pelo complexo *E. histolytica/E. dispar* e pelas diferentes espécies do complexo em pacientes atendidos pelos laboratórios do sistema privado e público de saúde de Salvador, Bahia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes/Amostragem

Os pacientes incluídos neste estudo foram provenientes dos laboratórios pertencentes ao sistema privado (Laboratórios Dirceu Ferreira, Qualitech, Centro de Medicina Laboratorial e Datalab) e público de saúde (Laboratórios de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia e do Hospital Universitário Professor Edgard Santos - UFBA), no período de 11/02/2006 e 20/08/2006. Aqueles que aceitaram participar deste estudo foram informados sobre a natureza do mesmo, responderam um questionário epidemiológico e assinaram o termo de consentimento pós-informado (em anexo). Este estudo foi submetido à análise da Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ) e aprovado sob o número 100/2006.

O diagnóstico parasitológico das amostras de fezes foi realizado nos serviços público e privado de saúde, onde as equipes envolvidas no diagnóstico parasitológico foram treinadas e capacitadas quanto à diferenciação das amebas que habitam o intestino humano previamente ao início da coleta do material. Ao todo foram examinadas 52.704 amostras de fezes, sendo 47.080 provenientes do serviço privado e 5.624 do serviço público (Figura 3). O serviço privado é composto por 27 postos de atendimento situados no município de Salvador-BA e região metropolitana (Lauro de Freitas e Simões Filho), distribuídos como se segue: laboratório Dirceu Ferreira (Matatu, São Marcos, Stela Mares, Imbuí, Vilas do

Atlântico, Itapoan, Garibaldi, Centro, Pituba, Bonfim, Liberdade e Cabula), laboratório Datalab (Graça, Pituba, Simões Filho, Imbuí, Barris, Roma, Brotas, Lauro de Freitas, Iguatemi e dois postos na Garibaldi) e laboratório Qualitech (Pituba, Centenário e Itaigara) (Figura 4). Os pacientes atendidos por estes laboratórios caracterizam-se por possuir maior nível sócio-econômico e cultural, com acesso à educação e saneamento básico. Com exceção da unidade Iguatemi do laboratório Datalab, que atende indivíduos admitidos e demitidos de grandes Empresas de engenharia e construção civil de Salvador-BA. Por outro lado, o serviço público caracteriza-se pelo atendimento à população de baixa renda, baixo nível educacional e condições de vida mais precárias estando, portanto, mais expostos aos fatores de riscos para aquisição de doenças parasitárias. Participaram deste grupo os laboratórios de análises clínicas do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos e da Faculdade de Farmácia – UFBA (Figura 4).

3.2 Exame Coproparasitológico

O diagnóstico da infecção causada pelo *complexo E. histolytica/E. dispar* foi realizado pelos laboratórios clínicos, citados no item 3.1, através da pesquisa de cistos, utilizando a metodologia de Hoffman, Lutz, Pons e Janer (Troll et al., 1997). O tamanho amostral mínimo foi calculado utilizando o programa EPI-INFO 6.0, estimando-se a prevalência da *E. histolytica/E. dispar* na população geral de Salvador-BA, segundo dados de Santos et al. (2006), como 3,2% e o desvio esperado de $\pm 10\%$, para intervalo de confiança (IC) de 95%. Em cada estimativa do tamanho amostral, foi incluído o número

total de habitantes em Salvador, como estimado pelo Senso 2000 (2.443.107 indivíduos). A amostragem mínima estimada pelo cálculo foi de 46.725 indivíduos da população geral, encontrando 1495 indivíduos positivos para o complexo *E. histolytica/E. dispar*. De acordo com Allanson-Jones et al. (1986) a *E. dispar* é nove a dez vezes mais prevalente que a *E. histolytica*, o que equivale a 149 pacientes infectados pela *E. histolytica*. Em nosso estudo foram estudados 52.704 pacientes e diagnosticados 1.788 portadores do complexo (Tabela 1). No universo de pacientes positivos para o complexo (1.788 pacientes) foram selecionados aqueles que aceitaram em participar do estudo e que possuíam quantidade suficiente de amostra para realizar as etapas do estudo (262). Portanto, as coletas ocorreram em dias intermitentes, não havendo cotas diárias de seleção de amostras. As amostras selecionadas foram encaminhadas para o Laboratório de Imuno-Parasitologia da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, onde o exame coproparasitológico foi confirmado e iniciado o processamento das amostras para o diagnóstico molecular. Cerca de 800 mg de cada amostra foi separada e congelada em tubos eppendorf a -20°C para posterior diagnóstico imunológico.

3.3 Diagnóstico molecular

3.3.1 Concentração dos Cistos

Para a concentração dos cistos foi realizada previamente uma comparação entre os métodos de Lutz, Hoffman, Pons e Janer (sedimentação espontânea), formol-éter, gradiente de sacarose e sulfato de zinco (FAUST), utilizando 25 amostras de fezes positivas para o complexo *E. histolytica/E. dispar* e para a *E. coli*. Após concentração por cada método referido acima, o de formol-éter (Troll et al., 1997) recuperou maior número de cistos, sendo então utilizado para análise das amostras do estudo, com algumas modificações. Resumidamente, cerca de 30 gramas de fezes foram diluídas e homogeneizadas em solução tamponada de formalina a 5% e filtradas por meio de um tamis. Em seguida, as fezes foram lavadas três vezes até clarificação do sobrenadante. Cerca de 7 ml do homogenato foi transferido para um tubo cônico de plástico, onde foram adicionados 3 ml de éter-etílico PA. Os tubos foram arrolhados e agitados vigorosamente por 30 segundos e centrifugados a 1.600 g por 3 minutos (centrífuga sorológica, Fanen Sp, Brasil). O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e o sedimento transferido para um tubo de eppendorf e lavado três vezes com 1,5 ml de PBS 1%, por 3 minutos, a 2.000 g. Após lavagem, foi preparada uma lâmina com 20 µl do sedimento, contendo uma gota de lugol e os cistos foram quantificados em objetiva de 40X, com a média aritmética de 10

campos. O restante do material foi armazenado e congelado a -20°C para posterior extração do DNA.

3.3.2 Extração do DNA

A extração do DNA dos cistos foi realizada de acordo com a metodologia de Acuna-Soto et al. (1993), com algumas modificações descritas abaixo. O sedimento resultante da técnica de formol-éter foi ressuspensão em 100 μl de Tampão Tris 100 mM, pH 8.0, EDTA 25 mM (Tampão 1). Em seguida, as amostras foram submetidas a seis ciclos sucessivos de congelamento, em gelo seco imerso em etanol PA, e descongelamento, em banho-maria a 50°C . Cada ciclo de congelamento e descongelamento teve duração de três minutos. Ao final deste processo, as amostras foram sonicadas (Sonicador Branson Sonifier 250), duas vezes, a uma amplitude de 35, durante o período de 30 segundos, na ausência de pulsos. Em seguida, a cada amostra foi adicionado 200 μl de Tampão Tris 100 mM, pH 8.0, EDTA 25 mM, SDS 1% contendo 200 μg de proteinase K (Tampão 2). As amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas em banho-maria a 50°C , por 24 horas, seguido de fervura por 10 minutos e centrifugadas a 12.000 g, por 5 minutos. Cada sobrenadante contendo DNA foi transferido para um tubo eppendorf e precipitado com 360 μl de isopropanol PA gelado. Os tubos foram agitados por inversão e centrifugados a 13.000 g por 15 minutos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente descartados e a cada tubo foi adicionado 500 μl de etanol 70%, gelado. As amostras foram então centrifugadas a 13.000

g por 5 minutos e, em seguida, os sobrenadantes desprezados. Os tubos foram emborcados sobre um papel absorvente e deixados nesta posição durante a noite para secagem do DNA. Em seguida, a cada tubo foi adicionado 20 µl de tampão de renaturação TRIS 10 mM, EDTA 1 mM (Promega Corporation USA), e as amostras estocadas a -20°C.

3.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase

Para as reações em cadeia da polimerase foram utilizados “*primers*” específicos, conforme descritos por Evangelopoulos et al. (2000), baseados na seqüência gênica que codifica a subunidade menor do RNA ribossomal. Este gene consiste em seqüências de inserção repetitiva as quais demonstram ser apropriadas para a detecção diferencial entre a *E. histolytica* e a *E. dispar*. De acordo com Ackers (2002), a utilização de seqüência alvo de múltiplas cópias propicia um aumento na sensibilidade da PCR. Além do mais, a especificidade intrínseca destes *primers* foi avaliada demonstrando que não houve amplificação com o DNA de *Endolimax nana*, *E. coli*, *Iodamoeba butschlii*, *Giardia lamblia*, *Isospora belli* e demais parasitos intestinais (Evangelopoulos et al., 2000). Também, a comparação da seqüência de *primers* com àqueles depositadas no banco de genes (*GenBank*), usando o programa BLAST verificou que não ocorreu reações cruzadas com outras espécies (Altschul et al., 1990).

Inicialmente um fragmento do DNA foi amplificado em 50 µl de reação contendo 5µl das amostras purificadas segundo item 3.4.2, 0.5 µM de cada *primer*, 5 µl de

tampão para PCR 10 X concentrado (Tris-HCl 200 mM, pH 8.4, KCl 500 mM), 0.2 mM de cada dNTP, MgCl₂ 1.5 mM e *Taq* DNA polimerase a 0.75 U (Gibco BRL, Rockville, MD). Na primeira reação da PCR foi amplificado um fragmento de 1076 pb referente às espécies do complexo *E. histolytica*/*E. dispar*, usando os *primers* E1 (5'TGC TGT GAT TAA AAC GCT3') e E2 (5'TTA ACT ATT TCA ATC TCG G3'). Na segunda reação da PCR foram utilizados os *primers* Eh-L (5'ACA TTT TGA AGA CTT TAT GTA AGT A3') e Eh-R (5'CAG ATC TAG AAA CAA TGC TTC TCT3'), específicos para *E. histolytica* que amplificaram um fragmento de 427 pb; e os *primers* específicos para *E. dispar*, Ed-L (5'GTT AGT TAT CTA ATT TCG ATT AGA A3') e Ed-R (5'ACA CCA CTT ACT ATA CCT ACC3'), amplificando um fragmento de 195 pb.

Na primeira reação da PCR, após desnaturação inicial do DNA a 94°C por 5 minutos, foram realizados 45 ciclos com as seguintes condições: 94°C por 1 minuto (desnaturação), 47°C por 1.5 minutos (anelamento) e 72°C por 2.5 minutos (extensão). Uma alíquota de 5 µl do produto amplificado nesta etapa foi usada na *nested* reação. O segundo ciclo de reações foi realizado em 50 µl usando as mesmas condições descritas acima, exceto a temperatura de anelamento, que passou a ser de 58°C.

Como controles negativos foram utilizadas amostras de fezes de indivíduos não portadores do complexo *E. histolytica*/*E. dispar*, com resultado coproparasitológico negativo, em três amostras de fezes analisadas através de microscopia óptica. As amostras de DNA provenientes de cepas HM-1 de *E. histolytica* e MCR de *E. dispar*, cultivadas de maneira axênica e polixênica, respectivamente, gentilmente cedidos pela Doutora Maria Aparecida Gomes, do Laboratório de Amebíase do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal da Minas Gerais, foram utilizadas como controles positivos.

3.3.4 Eletroforese em gel de agarose

Para detecção dos produtos de amplificação da PCR, 10 µl de cada amostra, obtida segundo item 3.4.3, foram aplicados ao gel de agarose a 1% (Invitrogen Life Technologies, USA) usando o tampão TAE 1X (Tris 2M, NaCl 1.66M, EDTA 0.1M) em cuba de eletroforese. O gel foi então submetido à tensão de 100 V por aproximadamente 40 minutos. Após corrida, o gel foi imerso em solução de brometo de etídio 0.5 µg/ml (Sambrook et al., 1998), por 15 minutos. A inspeção visual do gel foi feita em um transiluminador (Sigma Chem. Co., USA, modelo T1201) de luz ultravioleta, seguida de fotografia realizada com auxílio do sistema *EagleEye*.

3.3.5 Avaliação da reprodutibilidade da Multiplex-PCR

Para a reprodutibilidade intra-teste, foram selecionadas cinco amostras de fezes escolhidas aleatoriamente; duas positivas para *E. dispar* e três negativas para o complexo *E. histolytica/E. dispar*, testadas em duplicata. Como controle positivo para *E. histolytica* foram utilizadas duas das amostras negativas para o complexo enriquecidas com 5 µl de DNA provenientes de cultura axênica de *E. histolytica* (cepa HM-1) (Verweij et al., 2000). Para a reprodutibilidade inter-teste, foi utilizada uma amostra de DNA purificada de fezes de um paciente positivo para *E. dispar*, diagnosticado previamente pela PCR. Esta amostra

foi testada mensalmente durante seis meses, em ensaios para diagnóstico de outros pacientes. As amostras foram, então, submetidas à PCR segundo item 3.4.3 e em seguida foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%, segundo o item 3.4.4.

3.4 Análise Morfométrica

A análise morfométrica dos cistos foi realizada em 35 amostras positivas para o complexo que não amplificaram através da PCR e em 70 amostras positivas para a *E. dispar* que amplificaram na PCR, no Laboratório Central de Saúde Pública Gonçalo Moniz (LACEN-BA), utilizando um retículo de calibração de escala em milímetros (mm). Cada 0,01 mm da escala correspondeu a 10 µm na análise do tamanho dos cistos.

3.5 Pesquisa de Coproantígenos

Para a pesquisa de coproantígenos foram utilizadas 35 amostras que não amplificaram na PCR e 60 amostras escolhidas aleatoriamente que tiveram resultados positivos na PCR para *E. dispar*. Foi utilizado o método imunoenzimático comercial (ELISA, *E. histolytica* II – TechLab Inc., Blacksburg, VA, USA) baseado na detecção da

lectina galactose específica presente na superfície da *E. histolytica*, segundo os procedimentos do fabricante.

Resumidamente, uma gota do conjugado (anticorpo monoclonal específico para adesina de *E. histolytica*) marcado com peroxidase foi adicionada a cada poço da placa de microtitulação, previamente sensibilizada com anticorpos polinociais anti-adesina (AcPo). Em seguida, 200 µl das amostras de fezes de cada paciente, em torno de 200 mg diluídos em 400 µl de solução tampão com 0.02% de timerosal, foram adicionadas a cada poço.

As placas foram incubadas à temperatura ambiente, por duas horas e lavadas cinco vezes com solução de lavagem do fabricante. Em seguida, 2 gotas do substrato (tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio) foram adicionadas a cada poço e as placas foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Uma gota de solução de bloqueio (ácido sulfúrico 1M) foi adicionada a cada poço e a leitura das amostras foi efetuada no comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro para placa de ELISA (Bio-Rad – modelo 3550 UV). Os controles positivos e negativos, padrões do teste, foram utilizados juntamente com as amostras testadas.

3.6 Análise Estatística

Os resultados foram analisados no programa SPSS 9.0 *for Windows*. Para avaliação do melhor método de concentração de cistos foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon. Para avaliação da diferença estaticamente significativa entre as variáveis

raça, nível educacional e renda mensal foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, por se tratar de variáveis sem distribuição normal. Para o cálculo do tamanho amostral foi utilizado o programa EPI-INFO versão 6.0.

4. RESULTADOS

A prevalência do complexo *E. histolytica*/*E. dispar* nas amostras analisadas nos laboratórios incluídos neste estudo foi de 3,4%, sendo mais freqüente nas amostras provenientes do serviço público (5,0%) do que naquelas do serviço privado (3,2%). A prevalência estratificada por laboratório mostrou que a presença do complexo *E. histolytica*/*E. dispar* foi mais freqüente nas amostras provenientes da Rede Pública, principalmente no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Farmácia (Figura 3 e Tabela 1).

Na análise dos métodos de concentração dos cistos foi observado que o método de formol-éter concentrou 3.42 ($p=0.02$) e 7.74 ($p=0.008$) mais cistos de *E. histolytica* e *E. coli*, respectivamente, quando comparado com o de sedimentação espontânea. O método de formol-éter também concentrou 8.17 ($p<0.001$) e 6.49 ($p=0.021$) vezes mais cistos de *E. histolytica* e *E. coli*, respectivamente, do que o método de gradiente em sulfato de zinco (Tabela 2). Quando a concentração dos cistos nas fezes foi comparada entre os métodos de sedimentação espontânea, gradientes de sulfato de zinco e de sacarose, não houve diferenças significativas ($p>0.05$) (dados não mostrados).

As amostras de fezes positivas para o complexo *E. histolytica*/*E. dispar*, processadas pelo método de formol-éter, apresentaram uma média de 0.95 cistos por campo, com variações de 0.1 a 8 em objetiva de 40X (Tabela 3).

O diagnóstico diferencial da infecção causada pelo complexo *E. histolytica*/*E. dispar*, realizado pela Multiplex-PCR nas 262 amostras, revelou uma positividade de 86.6% ($n=227$) para *E. dispar*, não sendo identificado nenhum paciente infectado pela *E.*

histolytica (Tabela 3). Contudo, a amplificação das amostras de fezes contendo DNA de *E. histolytica* foi demonstrada após adição de DNA de *E. histolytica* proveniente de cultura axênica (HM-1) em amostras fecais negativas para o complexo *E. histolytica/E. dispar* (Figura 4).

A avaliação da positividade da Multiplex-PCR, utilizando amostras de DNA com diferentes diluições, mostrou que a maioria das amostras não diluídas foi amplificada pela PCR (55%) (Tabela 3). Entretanto, 31.7% das amostras amplificaram somente após diluições seriadas distribuídas da seguinte maneira: 20.6% amplificaram em diluições de 1:20, 7.3% em diluições de 1:40, 3.8% em diluições de 1:80 e 13.4% das amostras não amplificaram mesmo utilizando diluições de 1:160 (Tabela 3 e Figura 5). A média de cistos encontrada nas amostras amplificadas variou de 0.1 a 1.5, enquanto as amostras que não amplificaram continham em média 1.3 cistos por campo (Tabela 3).

Na reprodutibilidade intra-teste da Multiplex-PCR foi observado o mesmo padrão das bandas para cada uma das espécies das amostras testadas (Figura 6). De modo semelhante, a reprodutibilidade inter-teste mostrou um perfil de bandas compatível com a espécie nos diferentes períodos em que a amostra foi testada (figura 7).

Para as 35 amostras que não amplificaram na PCR e para 60 amostras positivas para *E. dispar* através da PCR foi realizado ensaio imunoenzimático específico para a *E. histolytica*, o qual demonstrou que todas as amostras foram negativas para este protozoário, sugerindo uma alta especificidade da PCR na pesquisa para a *E. histolytica*. Na diferenciação entre a *E. dispar* e a *E. hartmanni*, através do estudo morfométrico, foi demonstrado que todas as amostras analisadas possuíam cistos maiores que 10 µm sendo, portanto, compatíveis com o tamanho da *E. dispar*.

Os indivíduos com resultado coproparasitológico positivo para o complexo *E. histolytica/E. dispar* e que aceitaram participar do estudo (n=262) apresentaram uma média de idade de 35,7 anos, com variações entre 2 e 81 anos, sendo 64% pertencente ao sexo masculino e 36% ao feminino. O principal motivo que levou estes pacientes à realização de exames laboratoriais foi uma revisão anual de saúde. No entanto, 21,3% procuraram o médico com queixas de dores abdominais, flatulências e diarreia. Destes, 11,5 % relataram à utilização de metronidazol, afirmando estar no final do tratamento prescrito pelo médico. No momento da realização do exame coproparasitológico, somente 12,3% das fezes apresentavam aspecto diarreico ou pastoso.

A análise das variáveis sócio-econômicas revelou que a maioria dos pacientes positivos para o complexo *E. histolytica/E. dispar* considera-se negra ou mulata, totalizando um percentual de 65,5%. Aproximadamente 28% se diziam brancos e o restante amarela ou índia, não havendo diferença significativa entre negros, brancos e mulatos ($p>0,05$). De acordo com o nível educacional, foi observada uma homogeneidade entre os níveis, sendo o mais freqüente aqueles com escolaridade de nível médio (37,8%), não havendo diferença significativa entre os grupos. A renda variou entre menor que um e maior que cinco salários mínimos mensais, sendo observada uma maior presença de indivíduos com renda menor que 1 e entre 2 a 5 salários mínimos ($p<0,05$) (Tabela 4).

Quando foram analisadas as respostas sobre a fonte de água para consumo caseiro e pessoal, observou-se que 95% dos pacientes utilizam água proveniente do sistema de abastecimento público (EMBASA) e que 66% deles possuem o hábito de tratá-la antes do seu consumo pessoal. A medida profilática mais relatada foi a filtração (73,7%), porém, a cloração, a fervura ou utilização de mais de um método também foram citadas. No

entanto, 6,9% dos participantes relataram que fazem consumo da água sem nenhum tratamento prévio. Em relação ao consumo de vegetais crus, foi observado que 63,7% possuem este hábito diário e os métodos de higienização alimentar mais preconizados foram a imersão dos mesmos em vinagre (50,8%). Entretanto, 36,2% realizam a higienização destes alimentos apenas em água corrente. Os demais (6,9%) não realizam qualquer método de higienização dos vegetais antes de seu consumo (Tabela 5).

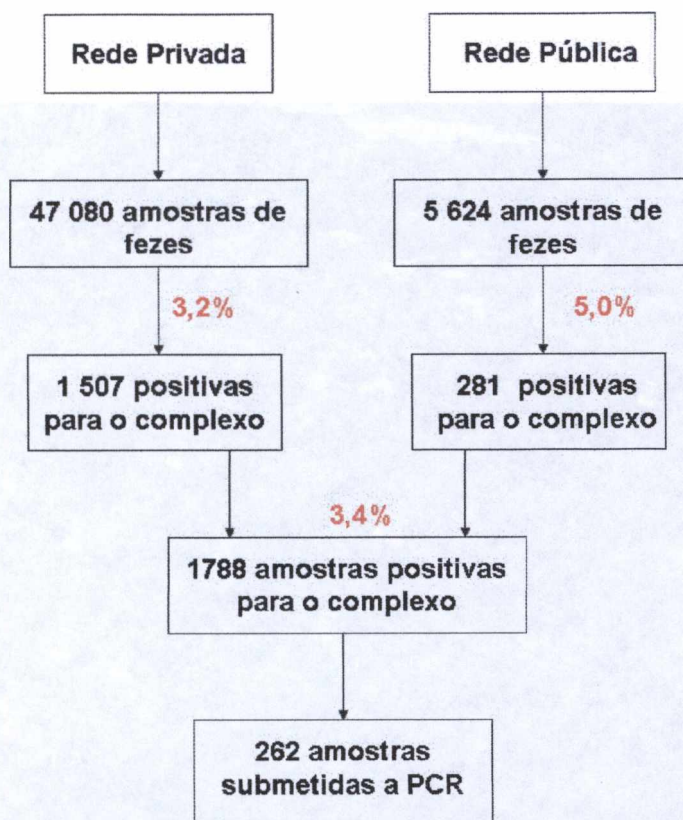


Figura 3. Fluxograma das amostras analisadas pelos laboratórios das redes privada e pública de Salvador-BA, no período de 11/02/2006 a 20/08/2006. A numeração em vermelho indica a prevalência do complexo *E. histolytica/E. dispar* nas amostras analisadas.

Figura 4. Imagem aérea do município de Salvador-BA e região metropolitana mostrando a distribuição dos pontos de atendimento aos laboratórios da rede privada: Duroca Ferreira, Qualitech e Duzidoh; e da rede pública: HUPEX - Faculdade de Farmácia (UFBA). Fonte: www.google.com.br (em 13/10/2007).

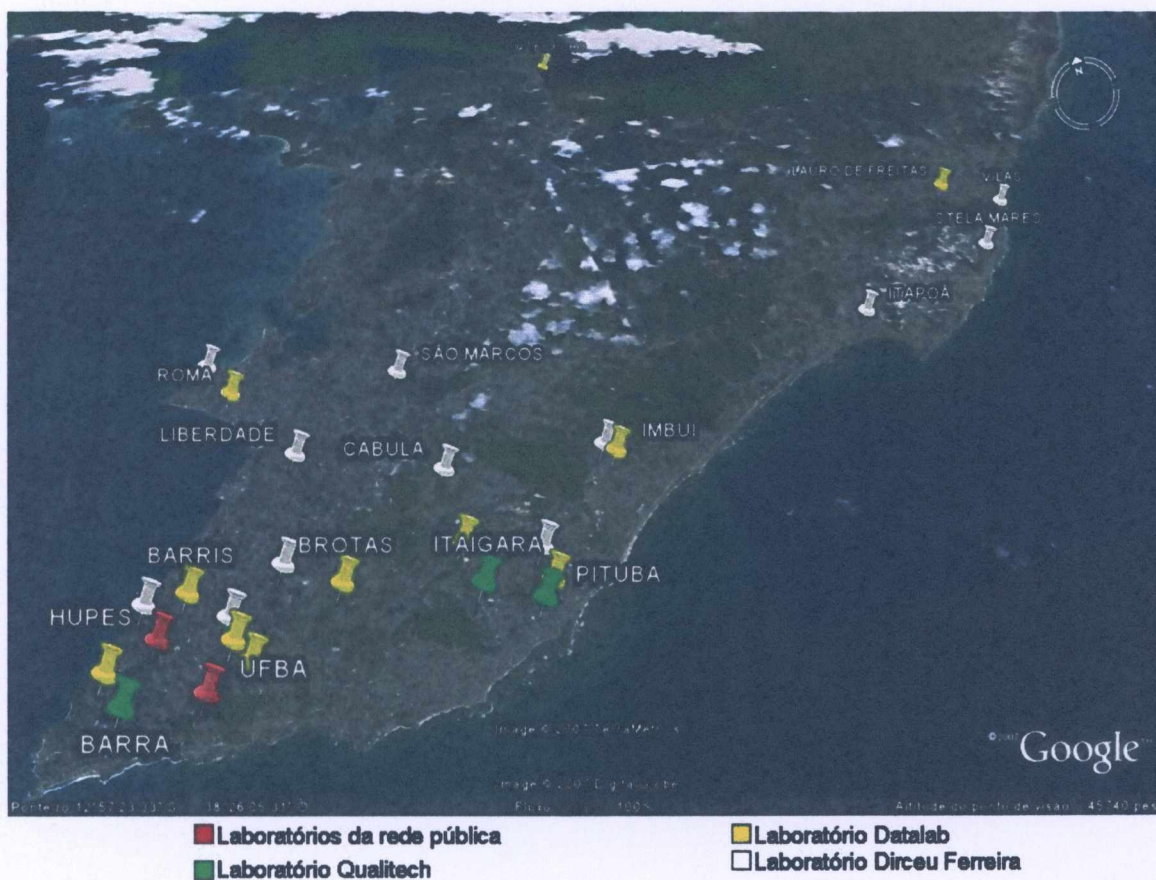


Figura 4. Imagem aérea do município de Salvador-BA e região metropolitana mostrando a distribuição dos postos de atendimento dos laboratórios da rede privada: Dirceu Ferreira, Qualitech e Datalab; e da rede pública: HUPES e Faculdade de Farmácia (UFBA). Fonte: www.googleearth.com (em 15/10/2007).

Tabela 1. Prevalência da infecção causada pelo complexo *E. histolytica/E. dispar* em pacientes atendidos nos laboratórios da rede privada e pública de Salvador-BA, no período de 11/02/2006 a 20/08/2006.

Laboratórios	Amostras	
	Total (n)	Positivas (%)
Rede Privada	47.080	1507 (3,2%)
Datalab	25.996	984 (3,8%)
Dirceu Ferreira	18.501	473 (2,6%)
Qualitech	2.583	50 (1,9%)
Rede Pública	5.624	281 (5,0%)
HUPES ¹	2.078	86 (4,1%)
Faculdade de Farmácia (UFBA)	3.546	195 (5,5%)
Rede Privada + Rede Pública	52.704	1788 (3,4%)

¹Hospital Universitário Professor Edgard Santos.

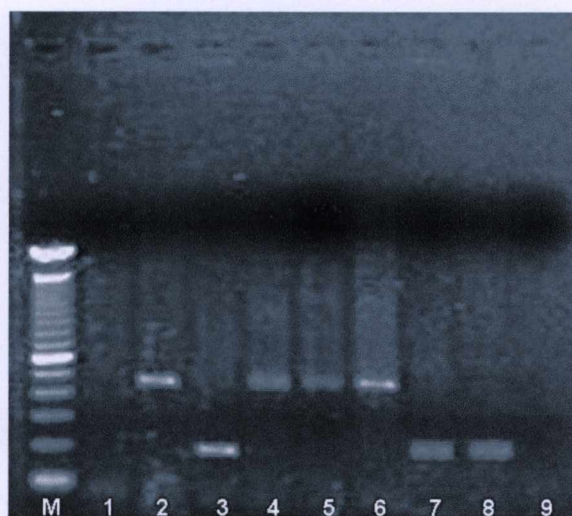


Figura 5. Produtos amplificados através de Multiplex-PCR com *primers* Eh-R/Eh-L e Ed-L/Ed-R. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. PM – padrão de peso molecular – 100 pb, 1 – controle negativo, 2 – controle positivo (*E. histolytica* – 427 pb), 3 – controle positivo (*E. dispar* – 195 pb), 4 a 6 – amostras de fezes negativas para o complexo *E. histolytica/E. dispar* contendo 3 μ l de DNA de *E. histolytica* proveniente de cultura axênica (cepa HM-1), 7 e 8 – amostras positivas para *E. dispar*, 9 – amostra negativa para o complexo *E. histolytica/E. dispar*.

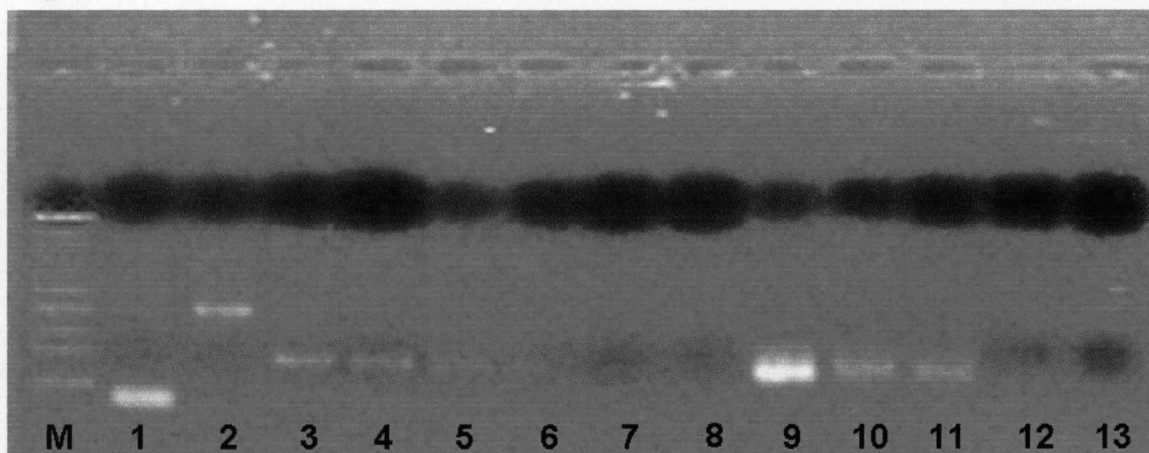


Figura 6. Produtos amplificados através de Multiplex-PCR. Avaliação da positividade da PCR utilizando amostras de fezes com padrões distintos de diluição. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. M – padrão de peso molecular – 100 pb, 1- controle negativo, 2 - controle positivo (*E. histolytica* – 427 pb), 3 – controle positivo (*E. dispar* – 195 pb), 4 - amostra de *E. dispar* (E35) amplificada sem diluição, 5 – diluição de 1:20, 6 – diluição 1:40, 7 – diluição 1:80, 8 – diluição 1:160, 9 – amostra de *E. dispar* (E108) amplificada sem diluição, 10- diluição 1:20, 11 – diluição 1:40, 12 – diluição 1:80 e 13 – diluição 1:160.

Tabela 3. Avaliação dos padrões de diluição do DNA purificado de amostras fecais positivas para o complexo *E. histolytica/E. dispar* (n=262) e do número de cistos presentes nas fezes na amplificação das amostras através da Multiplex-PCR.

Amostras		Amostras		Média de cistos por campo nas fezes
Diluição do DNA	n°	Amplificadas (%)	Não amplificadas	
Sem diluição	262	144 (55,0%)	118	1,5
1:20	118	54 (20,6%)	64	1,46
1:40	64	19 (7,3%)	45	0,4
1:80	45	10 (3,8%)	35	0,1
1:160	35	0 (0%)	35	1,3

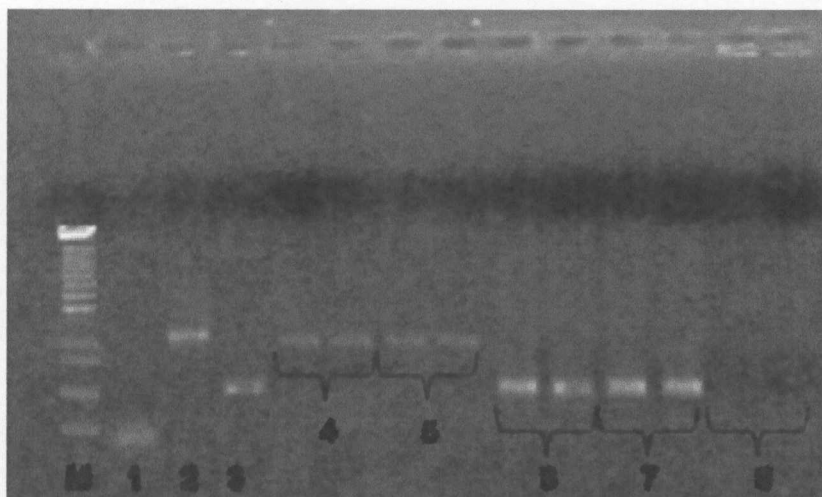


Figura 7. Avaliação da reprodutibilidade intra-teste. Produtos amplificados através de Multiplex-PCR. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. M – padrão de peso molecular – 100 pb, 1- controle negativo, 2 - controle positivo (*E. histolytica* – 427 pb), 3 – controle positivo (*E. dispar* – 195 pb), 4 e 5 - amostras de fezes negativas para o complexo *E. histolytica/E. dispar* contendo 3 μ l de DNA de *E. histolytica* proveniente de cultura axênica, cepa HM-1(Eh1 e Eh2), 6 -7 – amostras positivas para *E. dispar* (E108 e E139), 8 - amostra negativa para o complexo *E. histolytica/E. dispar*.

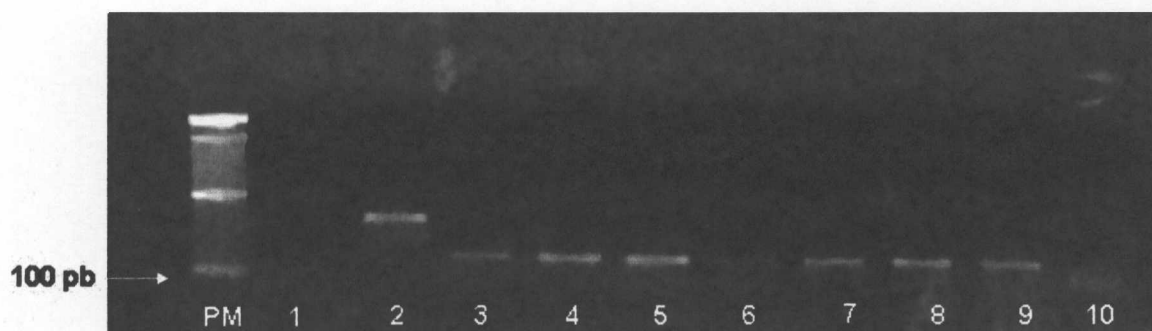


Figura 8. Avaliação da reprodutibilidade inter-teste. Produtos amplificados através de Multiplex-PCR. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. PM – padrão de peso molecular – 100 pb, 1- controle negativo, 2 - controle positivo (*E. histolytica* – 427 pb), 3 – controle positivo (*E. dispar* – 195 pb), 4 a 9 - amostras positivas para *E. dispar* amplificadas mensalmente durante um período de seis meses (E35), 10 - amostra negativa para o complexo *E. histolytica*/*E. dispar*.

Tabela 4. Análise das variáveis sócio-econômicas de 262 pacientes com resultado coproparasitológico positivo para o complexo *E. histolytica/E. dispar*, atendidos por laboratórios da rede privada e pública de saúde de Salvador-BA, no período de 11/02/2006 e 20/08/2006.

Variável	Categorias	N (%)	p*
Raça	Negros/Mulatos	172 (65,5%)	<0,05
	Branco	73 (27,9%)	<0,05
	Índios	13 (5%)	>0,05
	Amarelos	4 (1,6%)	>0,05
Nível educacional	Analfabetos	30 (11,4%)	>0,05
	Primário	73 (27,9%)	>0,05
	Médio	99 (37,8%)	>0,05
	Superior	60 (22,9%)	>0,05
Renda	<1	73 (27,9%)	<0,05
	1-2	69 (26,2%)	>0,05
	2-5	77 (29,5%)	<0,05
	>5	43 (16,4%)	>0,05

* O cálculo da significância estatística foi realizado pelo método de Kurskal-Wallis.

Tabela 5. Análise dos hábitos de consumo e tratamento de água e alimentos crus de 262 pacientes com resultado coproparasitológico positivo para o complexo *E. histolytica*/*E. dispar*, atendidos por laboratórios da rede privada e pública de saúde de Salvador-BA, no período de 11/02/2006 e 20/08/2006.

Variável	Categorias	N (%)
Fonte de água para consumo caseiro	Sistema público	249 (95%)
	Rio e/ou poços artesianos	13 (5%)
Fonte de água para consumo próprio	Tratada	173 (66%)
	Não tratada	89 (34%)
Medidas de higienização da água	Filtração	193 (73,7%)
	Cloração	26 (9,9%)
	Fervura	4 (1,5%)
	Mais de um método	21 (8%)
	Nenhum	18 (6,9%)
Consumo de vegetais crus	Sim	167 (63,7%)
	Não	95 (36,3%)
Preparação dos vegetais	Vinagre	133 (50,8%)
	Água	95 (36,2%)
	Hipoclorito	17 (6,5%)
	Nenhum	17 (6,5%)

5. DISCUSSÃO

A amebíase é uma infecção humana causada pela *Entamoeba histolytica*, sendo mais comum em determinados grupos populacionais. É considerada a segunda causa de óbito dentre as doenças parasitárias em todo o mundo, tendo grande impacto na saúde desta população. Rotineiramente, a amebíase tem sido diagnosticada através da pesquisa microscópica de cistos e/ou trofozoítos em espécimes clínicos. Um diagnóstico sensível e eficaz, utilizando metodologias capazes de diferenciar as espécies pertencentes ao complexo *E. histolytica/E. dispar*, é essencial para um tratamento adequado e acompanhamento dos pacientes (Ravdin, 1995).

Atualmente, existe um consenso sobre a importância de diferenciar a *E. histolytica* da *E. dispar*. A aceitação desta última como uma nova espécie modificou o entendimento da epidemiologia da amebíase e evidenciou a necessidade do desenvolvimento de técnicas diagnósticas capazes de diferenciar estas espécies (WHO, 1997). Por essa razão, nas últimas décadas houve um grande avanço no desenvolvimento de técnicas moleculares aplicadas ao diagnóstico deste protozoário. A pesquisa de coproantígenos possui vantagens quando comparada a outras metodologias utilizadas. No entanto, os antígenos das amostras podem ser desnaturados durante processos de preservação. Outra alternativa para diferenciação das espécies é a reação em cadeia da polimerase (PCR), que vem sendo utilizada com bastante frequência em estudos epidemiológicos (Valle et al., 2000; Evangelopoulos et al., 2001; Roy et al., 2005).

Em nossos estudos, durante o processo de padronização da PCR, foram testados alguns protocolos de concentração de cistos, extração de DNA e condições de amplificação.

O protocolo descrito no item Material e Métodos foi o escolhido por apresentar os melhores resultados. Entretanto, houve uma série de dificuldades ao longo da padronização. A primeira ocorreu durante a extração de DNA. Segundo Campos-Gongora et al. (2004), a parede cística das espécies pertencentes ao gênero *Entamoeba* é composta por quitina, um homopolímero constituído por unidades de N-acetil-D-glicosamina β -(1,4) que confere rigidez e resistência aos cistos. Portanto, para que ocorra o seu rompimento, é necessário que sejam aplicadas condições químicas e/ou físicas capazes de desestabilizar suas unidades estruturais. Por esta razão, os cistos concentrados foram submetidos a diversos protocolos de extração do DNA. Em muitos deles havia sucesso no rompimento da parede cística, como visto pela microscopia óptica, mas, por outro lado, havia também a degradação do material genético, mediante a não amplificação do material genético na PCR. Em outras situações, as condições empregadas não foram suficientes para o rompimento da parede cística, apesar do rompimento dos núcleos e da deformação dos cistos. Assim, o protocolo de escolha foi o de Acuna-Soto et al. (1993), com algumas modificações. Neste protocolo, os autores preconizam que os cistos sejam submetidos a três ciclos de congelamento e descongelamentos em gelo seco. Além disso, na etapa de sonicação, alguns protocolos aplicam somente um ciclo de sonicação por 10 segundos a amplitude máxima, sendo suficiente para romper os cistos. Entretanto, no presente estudo, foi observado que esta quantidade de ciclos não foi suficiente para um rompimento eficaz da parede cística e conseqüente liberação do DNA no meio. Para uma maior eficiência desta etapa, foram realizados seis ciclos de congelamento e descongelamento em intervalos de 3 minutos para cada. Na sonicação, quando utilizado o protocolo de Acuna-Soto et al. (1993), que utilizava a amplitude máxima do equipamento por 10 segundos, foi observada

uma degradação do material genético e uma não amplificação do mesmo na PCR. Na tentativa de aperfeiçoar esta etapa, a sonicação foi realizada em dois ciclos, a uma amplitude mais baixa, em um maior período de tempo, como descrito em material e métodos.

Uma outra dificuldade foi em relação à quantidade de DNA utilizada nas reações e as temperaturas de anelamento da PCR, tanto na primeira quanto na segunda reação. A diminuição da concentração de DNA, como visto na tabela 3, proporcionou uma redução de substâncias inibidoras provenientes do material fecal e um melhor rendimento na reação quando comparado ao protocolo original de Evangelopoulos et al. (2000). A alteração na temperatura de anelamento na primeira reação de 47°C para 50.7°C e na segunda de 58°C para 53.5°C também mostrou uma maior quantidade de material amplificado por reação. Dessa forma, o material genético foi preservado e a amplificação na PCR foi alcançada com sucesso, como pode ser observado na figura 3.

Fica evidente a dificuldade de purificar DNA a partir de amostras fecais, dada a resistência da parede cística para obtenção do material genético preservado e a presença de substâncias inibidoras inespecíficas existentes no sedimento fecal, capazes de inibir a ação da Taq polimerase (Deuter et al., 1995; Lantz et al., 1997; Holland et al., 2000; Verweij et al., 2000; Vandenberg et al., 2002). Ainda não existe uma uniformização quanto ao método de extração ideal, visto que, diversas substâncias podem atuar como inibidores (Monteiro et al., 1997; Wilson, 1997), ocasionando resultados falso-negativos na PCR, podendo variar entre diferentes populações, possivelmente em decorrência dos hábitos alimentares. De fato, na primeira fase deste estudo somente 55% das amostras analisadas foram amplificadas. Para as demais (31.6%) foi possível a amplificação do material genético após

realização de diferentes padrões de diluição. No total, 86.6% das amostras foram amplificadas pela PCR (Tabela 3). Possivelmente as substâncias inibidoras foram as principais causas da inibição, uma vez que o número de cistos por amostra não influenciou na reação de amplificação do DNA. Por outro lado, o número de amostras amplificadas diminuiu com o aumento do fator de diluição, indicando que o método perde a sensibilidade com a utilização de amostras muito diluídas (1:160, Tabela 3). A presença de substâncias inibidoras nas fezes, avaliada indiretamente através da adição do DNA do patógeno pesquisado, em algumas amostras não amplificadas, demonstrou que o DNA adicionado não foi amplificado mesmo após sucessivas diluições (técnica de *Spike*, dados não mostrados).

No ensaio imunoenzimático foi observado que as amostras que não amplificaram na PCR foram negativas para a *E. histolytica*. Além disso, a hipótese de que os pacientes poderiam estar infectados com a *Entamoeba hartmanni* também foi afastada pelo estudo morfométrico, verificando que o tamanho de todos os cistos analisados era compatível com os cistos da *E. dispar*. A possibilidade de a parede cística ter sofrido retração durante o congelamento foi afastada com a comparação do tamanho dos cistos presentes nas fezes negativas para a PCR com os provenientes das amostras amplificadas.

Alguns autores relatam a existência de outras amebas morfologicamente semelhantes ao complexo *E. histolytica/E. dispar*, como a *E. moshkovskii* e a *E. polecki*. A *E. moshkovskii* é encontrada em coleções hídricas dos mais variados tipos, desde água de esgoto, rios, córregos até fontes de água natural. No Brasil, este parasito é restrito a determinadas localidades e até a presente data não existe relatos de casos humanos (Felix-Silva, 1971; 1974). Também, a infecção causada pela *E. polecki* não foi descrita no país (Markell et al., 2003). Além do mais, neste estudo nenhum paciente relatou alguma

profissão relacionada à lida com suínos, que é diretamente associada à infecção por este protozoário. No entanto, na literatura científica internacional o envolvimento de outras espécies de *Entamoeba* no diagnóstico da amebíase vem sendo cada vez mais descrito. Na Coréia do Sul, segundo Choe et al. (1996), a prevalência da *E. histolytica* na população geral é superestimada em decorrência da falta de diferenciação deste protozoário da *E. dispar* e *E. hartmanni*. Casos de co-infecções já foram descritos. Ali et al. (2003) relataram prevalência de *E. moshkovskii* e sua associação com *E. histolytica* e *E. dispar* entre crianças em idade pré-escolar residentes em Bangladesh. Estudos mais aprofundados, capazes de determinar estas espécies, devem ser incentivados no Brasil, já que não é conhecida a real prevalência da *E. histolytica*, sendo os casos de infecção por amebas morfologicamente semelhantes tratados de forma indiscriminada.

Como todas as amostras examinadas neste estudo foram positivas para *E. dispar*, a PCR foi testada para amplificação específica de *E. histolytica* em amostras fecais negativas para o complexo *E. histolytica/E. dispar*, contendo 5 µl de DNA, provenientes de cultura axênica (cepa HM-1). Neste ensaio foi possível observar a amplificação do DNA em material fecal, confirmando a padronização do método para amplificação das duas espécies (Figura 3). Além do mais, a reprodutibilidade intra e inter-teste da multiplex-PCR mostrou que a PCR padronizada neste estudo pode ser utilizado com segurança no diagnóstico diferencial das amebas pertencentes ao complexo *E. histolytica/E. dispar* (Figuras 5 e 6).

Apesar de não ter sido possível comparar a sensibilidade do ensaio imunoenzimático com a multiplex-PCR, devido a inexistência de amostras positivas para a *E. histolytica* na população estudada, foi verificado que o ELISA possui uma elevada

especificidade. A literatura relata muitos pontos sobre as vantagens e desvantagens do uso destas técnicas. Mirelman et al. (1997) relataram que o ELISA (*E. histolytica* II – Techlab) é um teste específico para *E. histolytica*, capaz de detectar aproximadamente 100 trofozoítos. Entretanto, o teste não é capaz de detectar baixa carga parasitária especialmente em indivíduos assintomáticos de áreas endêmicas. Na rotina laboratorial, fica evidente que a PCR possui vantagens tanto na detecção quanto na diferenciação das espécies pertencentes ao complexo *E. histolytica/E. dispar*, além da capacidade de detectar infecções mistas (Evangelopoulos et al., 2000). Apesar destes fatos, Haque et al. (1998) demonstraram que, quando utilizados em estudos epidemiológicos, os testes não possuem diferenças significativas. De forma semelhante, Ackers (2002) mostrou que nenhuma das técnicas apresenta sensibilidade elevada quando utilizadas em amostras congeladas e/ou conservadas e que não seriam métodos adequados para utilização na rotina laboratorial. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, foi demonstrado que a PCR é uma metodologia trabalhosa que exige pessoal treinado para sua execução e, apesar de sua sensibilidade ter sido reduzida devido à presença de substâncias inibidoras nas fezes, pode ser utilizado com segurança para diferenciação das amebas do complexo.

Uma maneira de minimizar a influência dos inibidores enzimáticos presentes no DNA é através da utilização de colunas cromatográficas específicas. Verweij et al. (2000) propuseram a utilização destas colunas (QIAamp – Qiagen, Alemanha) e verificaram que somente 1.7% das 657 amostras analisadas não amplificaram na PCR. Segundo os autores, este método é rápido, simples e pode ser facilmente utilizado. No entanto, para o diagnóstico diferencial, o emprego das colunas onera o custo da PCR, inviabilizando o seu uso na rotina laboratorial.

A prevalência da infecção causada pelo complexo *E. histolytica/E. dispar* na amostra estudada foi de 3,4%, sendo de 3,2% para a rede privada de saúde e 5,0% para a rede pública. Este resultado já era esperado, uma vez que os pacientes pertencentes à rede pública possuem condições sócio-econômicas mais precárias, maiores dificuldades de acesso ao sistema de saúde e encontram-se mais expostos aos fatores relacionados à infecção (Benetton et al., 2005). É possível que a prevalência encontrada para os pacientes da rede privada tenha sido superestimada, pelo fato dos postos de coleta do laboratório Datalab atenderem indivíduos de baixa renda, encaminhados pela medicina ocupacional de Empresas de construção civil e outras de Salvador (BA). Quando esta prevalência foi estratificada por laboratório de origem, foi verificado que, dentre os da rede privada, o Qualitech teve a menor frequência. Este fato deve-se ao tipo de clientela atendida, caracterizada por um público com maior poder aquisitivo. Já a prevalência da amebíase intestinal dentre os pacientes atendidos pela Faculdade de Farmácia (UFBA) foi maior do que aquela observada pelo HUPES. Provavelmente, devido à prestação de serviço de saúde por esta instituição aos laboratórios da Prefeitura Municipal de Salvador (BA), localizados em bairros periféricos da cidade.

Das amostras positivas para o complexo *E. histolytica/E. dispar*, analisadas pela PCR (n=262), foi observada apenas a presença de *E. dispar*, sendo semelhantes aos dados descritos por Pinheiro et al. (2004), que avaliaram 1437 amostras de indivíduos residentes em Macaparana (PE) e observaram uma prevalência de 4,1% na população geral para a *E. dispar*, não encontrando *E. histolytica* na população examinada. Oliveira-Costa et al. (2006), após análise de 20.000 amostras de fezes oriundas da população geral da Grande Belo Horizonte (MG), atendida pela rede privada de saúde, relataram uma prevalência de 0,38% para a *E. dispar* diagnosticada através da PCR, não encontrando nenhuma amostra

positiva para a *E. histolytica*. Por outro lado, em alguns estados brasileiros tem sido demonstrada uma elevada prevalência da *E. histolytica*. Em Manaus (AM), a infecção atinge 6.8% da população (Benetton et al., 2005). Em Fortaleza (CE) 14.9% da população de baixa renda (Braga et al., 2001) e em Belém (PA) 29.5% dos indivíduos residentes na região metropolitana (Silva et al., 2005). Nas demais regiões brasileiras, ainda não há estudos que retratem a prevalência da *E. histolytica*. Este é o primeiro estudo realizado na Bahia, relatando a prevalência das espécies pertencentes ao complexo *E. histolytica/E. dispar*. Estudos com outras populações devem ser conduzidos na Bahia para um melhor entendimento da epidemiologia deste parasito na população.

De acordo com os resultados de Benetton et al. (2005), que estudaram a frequência da *E. histolytica/ E. dispar* em Manaus (AM), os fatores de risco mais comumente relacionados a este parasito são o local de residência, idade, consumo de vegetais crus, qualidade da água para consumo e a presença de outros protozoários intestinais. No presente estudo não foi possível realizar cálculos estatísticos dos fatores de risco relacionados às espécies de *E. histolytica* e/ou *E. dispar*, uma vez que os pacientes que realizaram a PCR tiveram resultados positivos apenas para *E. dispar*, e o questionário epidemiológico foi aplicado apenas para estes pacientes.

Foi observado que a maioria dos indivíduos infectados é afro descendente com renda mensal menor que 5 salários mínimos e com nível educacional médio ou superior (Tabela 4). No entanto, deve-se considerar que este dado não é relevante, já que 86% da população soteropolitana é afro descendente e de baixo nível sócio-econômico (Santana, 2004). A fonte de água para consumo caseiro descrita pelos pacientes foi àquela proveniente do sistema público de abastecimento (EMBASA), exceto 16.6% dos pacientes oriundos do HUPES, que relataram consumo de água de rios e/ou poços. Destes, 8.3%

referiram-se não tratar água previamente ao seu consumo. Segundo Benetton et al. (2005), o não tratamento da água antes de seu consumo é um fator de risco para a infecção pela *E. histolytica*/*E. dispar*. Um estudo conduzido no Vietnã demonstrou que a água proveniente de um rio era a fonte de infecção para a *E. histolytica* na amostra analisada (Blessman et al., 2002).

As indefinições sobre o diagnóstico diferencial do complexo *E. histolytica*/*E. dispar* precisam ser superadas, devido à necessidade de um tratamento eficaz para a *E. histolytica*. A PCR possui um custo elevado e a maioria dos laboratórios de rotina não possui infra-estrutura adequada para sua execução. A utilização desta metodologia em nosso país ainda está em fase inicial e seu uso é praticamente restrito aos centros de pesquisa situados, em sua grande maioria, nos centros urbanos de maior porte. No entanto, depois de implantada e padronizada possui um baixo custo. A maior limitação da técnica, neste estudo, foi a dificuldade de obtenção de DNA conservado a partir dos cistos e a presença de substâncias inibidoras capazes de atuar na função de amplificação da Taq polimerase. Pesquisas sobre metodologias mais simples, rápidas e de baixo custo devem ser estimuladas e, quando devidamente avaliadas, devem ser implantadas em laboratórios que compõem a rede pública e privada de saúde.

É necessário salientar que a magnitude dos nossos resultados é limitada diante do universo da cidade de Salvador. Outros estudos são necessários para verificar a presença da *E. histolytica* em grupos populacionais diversos, em especial aqueles de creches, asilos, presídios e da população que vive em condições precárias de saneamento básico.

6. ASPECTOS IMPORTANTES NO ESTUDO

- A presença de inibidores inespecíficos no sedimento fecal provavelmente reduziu a sensibilidade da PCR, observada através da não amplificação de 13.4% das amostras;
- A sensibilidade da PCR não está relacionada com a quantidade de cistos encontrados nas fezes, visto que não houve alteração na amplificação da reação quando as amostras com diferentes padrões de diluição foram utilizadas;
- A especificidade da PCR para o diagnóstico da *E. histolytica* foi de 100% quando comparada ao ensaio imunoenzimático (ELISA) específico para a adesina Gal e GalNac;
- Métodos capazes de elevar a sensibilidade da PCR devem ser investigados, com o objetivo de simplificar a metodologia de extração do DNA e fornecer uma quantidade suficiente de material genético livre de inibidores inespecíficos;
- De um modo geral, a prevalência da amebíase intestinal no Brasil deve ser reavaliada, por acreditar-se que há uma superestimativa desta protozoose, em decorrência dos métodos classicamente empregados no diagnóstico de rotina não diferenciarem a *E. histolytica* de espécies morfológicamente semelhantes.

7. CONCLUSÕES

- A PCR padronizada neste estudo pode ser utilizada no diagnóstico diferencial das espécies do complexo *E. histolytica/E. dispar*. No entanto, é uma metodologia trabalhosa, que exige pessoal treinado e equipamentos sofisticados;
- Dos pacientes positivos para o complexo *E. histolytica/E. dispar* que realizaram a PCR, 86.6% estavam verdadeiramente infectados pela *E. dispar*. Provavelmente, o restante dos mesmos (14.4%) também estava infectado por este mesmo protozoário, pelo fato de serem negativos para *E. histolytica* e *E. hartmanni*;
- A prevalência da infecção causada pela *E. histolytica/E. dispar* foi de 3.4 %, sendo maior nos pacientes atendidos pelo serviço público de saúde (5.0%) do que naqueles atendidos pelo serviço privado (3.2%), não estando relacionada com a idade, a raça e o nível educacional.

8. REFERÊNCIAS

- Abd-Alla, MD & Ravdin, JI. Diagnosis of amoebic colitis by antigen capture ELISA in patients presenting with acute diarrhoea in Cairo, Egypt. *Trop Med Int Health*, 7(4):365-70, **2002**.
- Abioye, AA. Fatal amoebic colitis in pregnancy and puerperium: a new clinico-pathological entity. *J Trop Med Hyg*, 76(4):97-100, **1973**.
- Abuabara, SF; Barrett, JA; Hau, T; Jonasson, O. Amebic liver abscess. *Arch Surg*, 117(2):239-44, **1982**.
- Ackers, J.P. The diagnostic implications of the separation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *J. Biosci.*, 27(6): Suppl. 3:573-578, **2002**.
- Acuna-Soto, R; Samuelson, J; De Girolami, P; Zarate, L; Millan-Velasco, F; Schoolnick, G; Wirth, D. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg*, 48(1):58-70, **1993**.
- Acuna-Soto, R; Maguire, JI; Wirth, DF. Gender distribution in asymptomatic and invasive amebiasis. *Am J Gastroenterol*, 95(5):1277-83, **2000**.
- Adams, EB & MacLeod, IN. Invasive amebiasis. I. Amebic dysentery and its complications. *Medicine (Baltimore)*, 56(4):315-23, **1977a**.
- Adams, EB & MacLeod, IN. Invasive amebiasis. II. Amebic liver abscess and its complications. *Medicine (Baltimore)*, 56(4):325-34, **1977b**.
- Akisu, C; Aksoy, U; Cetin, H; Ustun, S; Akisu, M. Effect of human milk and colostrum on *Entamoeba histolytica*. *World J Gastroenterol*, 10(5):741-2, **2004**.
- Allanson-Jones, E; Mindel, A; Sargeant, P; Williams, P. *Entamoeba histolytica* as a commensal intestinal parasite in homosexual men. *N. Engl.J. Med.*, 315(6):353-6, **1986**.
- Ali, IK; Hossain, MB; Roy, S; Aych-Kumi, PF; Petri, WA; Haque, R; Clark, CG. *Entamoeba moshkovskii* infections in children, Bangladesh. *Emerg Infect Dis.*, 9(5): 580-4; **2003**.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410, **1990**.
- Argenzio, RA; Lecce, J; Powell, DW. Prostanoids inhibit intestinal NaCl absorption in experimental porcine cryptosporidiosis. *Gastroenterology*, 104(2):440-7, **1993**.
- Arellano, J; Granados, J; Frenk, P; Lopez-Osuma, M; Santos, I; Kretschmer, RR. Increased frequency of HLA-DR3 in Mexican mestizo pediatric patients with amebic liver abscess (ALA). *Arch Med Res*, 23(2):269-70, **1992**.
- Arellano, J; Perez-Rodrigues, M; Lopez-Osuma, M; Velazquez, JR; Gramados, J; Justiniani, N; Santos, JL; Madrazo, A; Munoz, L; Kretschmer, R. Increased frequency of HLA-DR3 and complotype SCOI in Mexican mestizo children with amoebic abscess of the liver. *Parasite Immunol*, 18(10):491-8, **1996**.
- Aristizabal, H; Acevedo, J; Botero, M. Fulminant amebic colitis. *World J Surg*, 15(2):216-21, **1991**.

- Ashbolt, NJ. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology*, 198(1-3):229-39, **2004**.
- Bank, S; Burns, DG; Marks, IN; Stein, D. The clinical spectrum of amoebic colitis. *S Afr Med J*, 45(9):219-25, **1971**.
- Barbosa, F. C.; Ribeiro, M. C. M.; Marçal Jr, O. Comparação da prevalência de parasitoses intestinais em escolares da zona rural de Uberlândia (MG). *Revista de Patologia Tropical*, 34(2):151-154, **2005**.
- Barnes, PF; De Cock, KM; Reynolds, TN; Ralls, PW. A comparison of amebic and pyogenic abscess of the liver. *Medicine (Baltimore)*, 66(6):472-83, **1987**.
- Benetton, ML; Gonçalves, AV; Meneghini, ME; Silva, EF; Carneiro, M. Risk factors for infection by the *Entamoeba histolytica/E. dispar* complex: an epidemiological study conducted in outpatient clinics in the city of Manaus, Amazon Region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 99(7):532-40, **2005**.
- Berninghausen, O & Leippe, M. Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. *Infect Human*, 65(9):3615-21, **1997**.
- Beubler, E; Kollar, G; Saria, A; Bukhave, K; Rask-Madsen, J. Involvement of 5-hydroxytryptamine, prostaglandin E₂ and cyclic adenosine monophosphate in cholera toxin-induced fluid secretion in the small intestine of the rat *in vivo*. *Gastroenterology*, 96(2 Pt 1):368-76, **1989**.
- Beubler, E; Schuligoi, R; Chopra, AK; Peskar, BA. Cholera toxin induces prostaglandin synthesis via posttranscriptional activation of cyclooxygenase-2 in the rat jejunum. *J Pharmacol Exp Ther*, 297(3):940-5, **2002**.
- Bhattacharya, A; Arya, R; Clark, CG; Ackers, JP. Absence of lipophosphoglycan-like glycoconjugates in *Entamoeba histolytica*. *Parasitology*, 120:31-5, **2000**.
- Blessmann, J.; Van, L. P.; Nu, P. A. T.; Thi, H. D.; Muller-Myhsok, B.; Buss, H.; Tannich, E. Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in central Vietnam. *Am J Trop Med Hyg*, 66:578-583, **2002**.
- Boeck, W.; Drbohlav, J. The cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Hyg.*, 5:371-407, **1925**.
- Braga, LL; Lima, AA; Sears, CL; Newman, RD; Wuhib, T; Paiva, CA; Guerrant, RL; Mann, BJ. Seroepidemiology of *Entamoeba histolytica* in a slum in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 55(6):693-7, **1996**.
- Braga, LL; Gomes, ML; Silva, MW; Paiva, C; Sales, A; Mann, BJ. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections as detected by monoclonal antibody in an urban slum in Fortaleza, Northeast Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 34(5):467-71, **2001**.
- Braun, TI.; Fekete, T; Lynch, A. Strongyloidiasis in an institution for mentally retarded adults. *Arch Intern Med*, 148(3):634-6, **1988**.
- Brumpt, E. Étude sommaire de l'Entamoeba dispar n.sp. Amibe à kystes quadrinuclées, parasite de l'homme. *Bull. Acad. Med.*, 94:943, **1925**.
- Bundesen, HN; Tonney, FO; Rawlings, ID. The outbreak of amebiasis in Chicago during 1933. Sequence of events. *JAMA*, 102:367-72, **1934**.

- Burch, D.J.; Li, E.; Reed, S.; Jackson, T.F.; Stanley S.L. Isolation of a strain-specific *Entamoeba histolytica* cDNA clone. *J Clin Microbiol*, 29(4):696-701, **1991**.
- Caballero-Salcedo, A; Viveros-Rogel, M; Salvatierra, B; Tapia-Conyer, R; Sepúlveda-Amor, J; Gutiérrez, G; Ortiz-Ortiz, L. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*, 50(4):412-9, **1994**.
- Calalb, MB; Polte, TR; Hanks, SK. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src kinases. *Mol Cell Biol*, 15(2):954-63, **1995**.
- Campos-Gongora, E.; Ebert, F.; Willhoelt, U.; Said-Fernandez, S.; Tannich, E. Characterization of chitin synthases from *Entamoeba*. *Protist*, 155(3):323-330, **2004**.
- Campos-Rodríguez, R; Jarillo-Luna, A. The pathogenicity of *Entamoeba histolytica* is related to the capacity of evading innate immunity. *Parasite Immunol*, 27:1-8, **2005**.
- Cardoso, JM; Kimura, K; Stopen, M; Cervantes, LF; Flizondo, I; Churchill, R; Moncada, R. Radiology of invasive amebiasis of the colon. *Am J Roentgenol*, 128(6):935-41, **1977**.
- Cardoso, GS; Santana, ADC; Aguiar, CP. Prevalência e aspectos epidemiológicos da giardíase em creches do município de Aracajú, SE, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 28:25-31, **1995**.
- Chadee, K; Petri, WA; Innes, DJ; Ravdin, JI. Rat and human colonic mucins bind to and inhibit the adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest*, 80(5):1245-54, **1987**.
- Chaker, E; Keller, F; Sommer, A; Kremer, M. Focus of amebiasis in a psychiatric hospital in the east of France. *Arch Inst Pasteur Tunis*, 58(1-2): 15-37, **1981**.
- Chierici, R. Antimicrobial actions of lactoferrin. *Adv Nutr Res*, 10:247-69, **2003**.
- Choe, SC; Lee, M; Lee, SK; Im, K; Tannich, E; Lee SH; Hong, ST. Differentiation of Korean isolates of *Entamoeba histolytica* from *Entamoeba dispar*. *Korean J Parasitol.*, 34(1): 15-20, **1996**.
- Clark, C.G. Amoebic disease *Entamoeba dispar*, an organism reborn. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 92:361-364, **1998**.
- Clark, C. G. & Diamond, L. S. Ribosomal RNA genes of 'pathogenic' and 'nonpathogenic' *Entamoeba histolytica* are distinct. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 49(2):297-302, **1991**.
- Clark, CG & Roger, AJ. Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(14):6518-21, **1995**.
- Cummins, AJ; Moody, AH; Lalloo, K; Chiodini, PL. Rapid latex agglutination test for extraluminal amoebiasis. *J Clin Pathol*, 47(7):647-8, **1994**.
- Cunha, A.S.; Ferari, M.I.A. Amebíase e infecções por amebídeos de vida livre. In: Castro, L.P.; Cunha, A.S.; Rezende, J.M. *Protozooses Humanas 5ª ed.* Fundação BYB, **1994**, p 100-123.
- Denis, M & Chadee, K. In vitro and in vivo studies of macrophage functions in amebiasis. *Infect Immun*, 56:3126-31, **1988**.
- DeBakey, ME & Ochsner, A. Hepatic amebiasis: a 20 year experience and analysis of 263 cases. *Surg Gynecol Obstet*, 92(3):209-31, **1951**.
- Deuter, R.; Pietsch, S.; Hertel, S.; Muller, O. A method for preparation of fecal DNA suitable for PCR. *Nucleic Acids Res.*, 23(18):3800-3801, **1995**.

- Diamond, L.S. & Clark, C.G. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911), separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol*, 40:340-4, **1993**.
- Díaz, E; Mondragon, J; Ramirez, E; Bernal, R. Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide in children in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*, 68(4):384-5, **2003**.
- Diniz, LSM; Costa, EO; Oliveira, PM. Clinical disorders observed in anteaters (Mymecophagidae, Edentata) in captivity. *Vet Res Comm*, 19(5):409-15, **1995**.
- Douado, A.; Maciel, A.; Aca Ida, S. Occurrence of *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* in ambulatory patients of Recife, PE. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 39(4):388-389, **2006**.
- Ellyson, JH; Bezmalinovic, Z; Parks, SN; Lewis, FR. Necrotizing amebic colitis: a frequently fatal complication. *Am J Surg*, 152(1):21-6, **1986**.
- Elsdon-Dew, R. The epidemiology of amebiasis. *Adv Parasitol*, 6:1-62, **1968**.
- Evangelopoulos, A; Spanakos, G; Patsoula, E; Vakalis, N; Legakis, N. A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces. *Ann Trop Med Parasitol*, 94(3):233-40, **2000**.
- Evangelopoulos, A; Legakis, N; Vakalis, N. Microscopy, PCR and ELISA applied to the epidemiology of amebiasis in Greece. *Parasitol Int*, 50(3):185-9, **2001**.
- Felix-Silva, E. Isolation of *Entamoeba moshkovskii* from the Araguaia river, Central Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 65(3):400, **1971**.
- Felix-Silva, E.; Mayrink, W. Studies on *Entamoeba moshkovskii*. II. New foci in various types of water collections in Brazil and Uruguay. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 16(4):203-221, **1974**.
- Ferreira, CB & Marçal, JR. Enteroparasitoses em escolares do Distrito de Martinésia, Uberlândia, MG: um estudo piloto. *Rev Soc Bra Med Trop*, 30(5):373-7, **1997**.
- Garcia, LS & Bruckner, DA., 1997. Diagnostic medical parasitology, 3rd ed. ASM Press, Washington, D. C.
- Garfinkel, L.I, Giladi, M.; Huber, M.; Gitler, C.; Mirelman, D.; Revel, M.; Rozenblatt, S. DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and nonpathogenic zymodemes. *Infect Immun.*, 57(3):926-931, **1989**.
- Gathiram, V & Jackson, TF. A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *S Afr Med J*, 72(10):669-72, **1987**.
- Gatti, S; Cevini, C; Marchi, L; Novati, S; Scaglia, M. *Entamoeba histolytica* autochthonous isolates from mentally retarded Italian patients. *Parasitol Res*, 81(2):148-51, **1995**.
- González-Ruiz, A; Haque, R; Aguirre, A; Castañón, G; Hall, A; Guhl, F; Ruiz-Palacios, G; Miles, MA; Warhurst, DC. Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. *J Clin Pathol*, 47(3):236-9, **1994a**.
- González-Ruiz, A; Haque, R; Rehman, T; Aguirre, A; Hall, A; Guhl, F; Warhurst, DC; Miles, MA. Diagnosis of amebic dysentery by detection of *Entamoeba histolytica* fecal antigen by an invasive strain-specific, monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*, 32(4):964-70, **1994b**.

- Guerrant, RL; Brush, JI; Ravdin, JL; Sullivan, JA; Mandell, GL. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *J Infect Dis*, 143(1):83-93, **1981**.
- Haque, R; Neville, LM; Hahn, P; Petri, WA. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. *J Clin Microbiol*, 33(10):2558-61, **1995**.
- Haque, R; Ali, IK; Akther, S; Petri, WA. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Microbiol*, 36(2):449-52, **1998**.
- Haque, R; Ali, IM; Petri, WA. Prevalence and immune response to *Entamoeba histolytica* infection in preschool children in Bangladesh. *Am J Trop Hyg*, 60:1031-4, **1999**.
- Haque, R; Mollah, NU; Ali, IK; Alam, K; Eubanks, A; Lyerly, D; Petri, WA. Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. *J Clin Microbiol*, 38(9):3235-9, **2000**.
- Holland, J.L.; Loquie, B.; Simor, A.E.; Loquie, M. PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7 from stools: evaluation of commercial extraction methods for purifying fecal DNA. *J. Clin. Microbiol.*, 38(11):4108-4113, **2002**.
- Hung, CC; Chen, PJ; Hsieh, SM; Wong, JM; Fang, CT; Chang, SC; Chen, MY. Invasive amoebiasis: an emerging parasitic disease in patients infected with HIV in an area endemic for amoebic infection. *AIDS*, 13(17):2421-8, **1999**.
- Huston, CD; Haque, R; Petri, WA. Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 1-11, 1999.
- Istre, GR; Kreiss, K; Hopkins, RS; Healy, GR; Benziger, M; Canfield, TM; Dickinson, P; Englert, TR; Compton, RC; Mathews, HM; Simmons, RA. An outbreak of amebiasis spread by colonic irrigation at a chiropractic clinic. *N Engl J Med*, 307(6):339-42, **1982**.
- Jackson, TF; Anderson, CB; Simjee, AE. Serological differentiation between past and present infection in hepatic amoebiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 78(3):342-5, **1984**.
- Jackson, TF; Gathiram, V; Simjee, AE. Seroepidemiological study of antibody responses to the zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *Lancet*, 1(8431):716-9, **1985**.
- Jackson, T.F.H.G. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. *Int. J. Parasitol.*, 28(1): 181-186, **1998**.
- Jammal, MA; Cox, K; Ruebner, B. Amebiasis presenting as rectal bleeding without diarrhea in childhood. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 4(2):294-6, **1985**.
- Jelinek, T; Peyerl, G; Löscher, T; Nothdurft, HD. Evaluation of an antigen-capture enzyme immunoassay for detection of *Entamoeba histolytica* in stool samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 15(9):752-5, **1996**.
- Jetter, A; Walderich, B; Britten, D; Mete, O; Goral, V; Burchard, GD; Ackers, J. An epidemiological study of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* infection in eastern Turkey using a colorimetric polymerase chain reaction. *Arch Med Res*, 28:319-21, **1997**.
- Kapoor, OP. Amebic liver abscess. *Bombay Hospital Journal*, 332: 5-8, **1990**.

- Katzenstein, D; Rickerson, V; Braude, A. New concepts of amebic liver abscess derived from hepatic imaging, serodiagnosis, and hepatic enzymes in 67 consecutive cases in San Diego. *Medicine (Baltimore)*, 61(4):237-46, **1982**.
- Katzwinkel-Wladarsch, S; Loscher, T; Rinder, H. Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from stool specimens. *Am J Trop Med Hyg*, 51:115-8, **1994**.
- Kcene, WE; Petitt, MG; Allen, S; McKerrow, JH. The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med*, 163(3):536-49, **1986**.
- Kelsall, BL & Ravdin, JL. Degradation of human IgA by *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis*, 168(5):1319-22, **1993**.
- Knobloch, J & Mannweiler, E. Development and persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica* in patients with amebic liver abscess: Analysis of 216 cases. *Am J Trop Med Hyg*, 32(4):727-32, **1983**.
- Kobayashi, J.; Hasegawa, H.; Forli, A. A.; Nishimura, N. F.; Yamanaka, A.; Shimabukuro, T.; Sato, Y. Prevalence of intestinal parasitic infection in five farms in Holambra, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, 37(1):13-18, **1995**.
- Kreidl, P; Imnadze, P; Baidoshvili, L; Greco, D. Investigation of an outbreak of amoebiasis in Georgia. *Eurosurveillance*, 4(10):103-4, **1999**.
- Kretschmer, R; Collado, ML; Pacheco, MG; Salinas, MC; Lopez-Osuma, M; Lecuona, M; Castro, EM; Arellano, J. Inhibition of monocyte locomotion by products of axenically grown *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol*, 7(5):527-43, **1985**.
- Kretschmer, RR; Rico, G; Giménez, JA. A novel anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica*. *Mol Bioch Parasitol*, 112(2):201-9, **2001**.
- Krogstad, DJ; Spencer, HC; Healy, GR; Gleason, NN; Sexton, DJ; Herron, CA. Amebiasis: epidemiologic studies in the United States, 1971-1974. *Ann Inter Med*, 88(1):89-97, **1978**.
- Krogstad, DJ; Spencer, HC; Healy, GR; Gleason, NN; Sexton, DJ; Herron, CA. Amebiasis: epidemiologic studies in the United States, 1971-1974. *Ann Inter Med*, 88(1):89-97, **1978**.
- LaFlamme, SE & Auer, KL. Integrin signaling. *Seminars in Cancer Biology*, 7(3):111-8, **1996**.
- Lantz, P.G.; Matson, M.; Waldström, T.; Radström, P. Removal of PCR inhibitors from human fecal sample through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *J. Microbiol. Methods*, 28:159-167, 1997.
- Leippe, M; Tannich, E; Nickel, R; van der Goot, G; Pattus, F; Horstmann, RD; Muller-Eberhard, HJ. Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *EMBO J*, 11(10):3501-6, **1992**.
- Leippe, M; Andra, J; Nickel, R; Tannich, E; Muller-Eberhard, HJ. Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Mol Microbiol*, 14(5):895-904, **1994**.
- Leippe, M; Sievertsen, HJ; Tannich, E; Horstmann, RD. Spontaneous release of cysteine proteinases but not of pore-forming peptides by viable *Entamoeba histolytica*. *Parasitology*, 111(Pt 5):569-74, **1995**.

- Leroy, A; Lauwaet, T; De Bruyne, G; Cornelissen, M; Marcel, M. *Entamoeba histolytica* disturbs the tight junction complex in human enteric T84 cell layers. *FASEB J*, 14(9):1139-46, **2000**.
- Levine, N.D.; Corliss, J.O.; Cox, F.E.; Deroux, G.; Grain, J.; Honigberg, B.M.; Leedale, G.F.; Loeblich, A.R.; Lom, J.; Lynn, D.; Merinfeld, E.G.; Page, F.C.; poljansky, G.; Sprague, V.; Vayra, J.; Wallace, F.G. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool.*, 27(1):37-58, **1980**.
- Lewis, EA & Antia, AU. Amoebic colitis: review of 295 cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 63:633-8, **1969**.
- Li, E; Stenson, WF; Kunz-Jenkins, C; Swanson, PE; Duncan, R; Stanley, SL. *Entamoeba histolytica* interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells. *Infect Immun*, 62(11):5112-9, **1994**.
- Lotter, H; Mannweiler, E; Tannich, E. Crude or recombinant proteins applied to latex agglutination, complement-fixation and enzymelinked immunosorbent assays for the serodiagnosis of invasive amebiasis. *Trop Med Parasitol*, 44(4):277-80, **1993**.
- Lotter, H; Jackson, TF; Tannich, E. Evaluation of three serological tests for the detection of antiamebic antibodies applied to sera of patients from an area endemic for amebiasis. *Trop Med Parasitol*, 46(3):180-2, **1995**.
- Lowther, SA; Dworkin, MS; Hanson, DL. *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* infections in human immunodeficiency virus-infected patients in the United States. *Clin Infect Dis*, 30(6):955-9, **2000**.
- Marinho, E. J. C. Estudo epidemiológico da *Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903) e *Entamoeba hartmanni* (Prowazek, 1912), em um bairro do Município de Santa Cruz, RN. Tese de Mestrado apresentada a Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. Departamento de Prática de Saúde Pública para obtenção do grau de Mestre, **1984**.
- Markell, EK; Havens, RF; Kuritsubo, RA; Wingerd, J. Intestinal protozoa in homosexual men of the San Francisco Bay area: prevalence and correlates of infection. *Am J Trop Med Hyg*, 33(2):239-45, **1984**.
- Markell, EK; John, DT; Krotoski, WA. Protozoários que habitam a luz. In: Markell & Voge Parasitologia Médica. 8ª Ed., Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, **2003**.
- Martinez-Palomo, A.; Gonzáles-Robles, A.; De la Torre, M. Selective agglutination of pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* induced con A. *Nat New Biol.*, 245(145):186-187, **1973**.
- McGee, DW. 1999. Inflammation and mucosal cytokine production, p. 559-573. In PL Ogra, J Mestecky, ME Lamm, W Strober, J Bienenstock, JR McGhee (ed.), *Mucosal immunology*. Academic Press, Inc., San Diego, California.
- Merritt, RJ; Coughlin, E; Thomas, DW; Jariwala, L; Swanson, V; Sinatra, FR. Spectrum of amebiasis in children. *Am J Dis Child*, 136(9):785-9, **1982**.
- Mirelman, D.; Nuchamowitz, Y.; Stolarsky, T. Comparison of use Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-Based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. *J Clin Microbiol*, 35(9):2405-2407, **1997**.
- Monteiro, L.; Bonnemaïson, D.; Vekris, A.; Petry, K.G.; Bonnet, J.; Vidal, R.; Cabrita, J.; Megraud, F. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol.*, 35(4):995-998, **1997**.

- Moody, S; Becker, S; Nuchamowitz, Y; Mirelman, D. An improved colorimetric PCR-based method for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in feces. *J Clin Microbiol*, 35(5):1108-11, **1997**.
- Moody-Haupt, S; Patterson, JH; Mirelman, D; McConville, MJ. The major surface antigens of *Entamoeba histolytica* trophozoites are GPI-anchored proteophosphoglycans. *J Mol Biol*, 297(2):409-20, **2000**.
- Nagarura, K; Tachibana, H; Tanara, T; Kaneda, Y; Tokunaga, M; Sasao, M; Takeuchi, T. An outbreak of amebiasis in an institution for the mentally retarded in Japan. *Jpn J Med Sci Biol*, 42(2):63-76, **1989**.
- Nagarura, R; Tachibana, H; Kaneda, Y; Suzuki, H; Sasaoka, K; Kobayashi, S; Takeuchi, T. Amebiasis in institutions for the mentally retarded in Kanagawa Prefecture, Japan. *Jpn J Med Sci Biol*, 43(4):123-31, **1990**.
- Nozaki, T; Aca, IS; Okuzawa, E; Magalhaes, M; Tateno, S; Takeuchi, T. Zymodemes of *Entamoeba histolytica* isolated in the Amazon and north-east of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 84(3):387-8, **1990**.
- Ohnishi, K & Murata, M. Present characteristics of symptomatic amebiasis due to *Entamoeba histolytica* in the east-southeast area of Tokyo. *Epidemiol Infect*, 119(3):363-7, **1997**.
- Ojcius, DM & Young, JDI. Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif? *Trends Biochem Sci*, 16:225-9, **1991**.
- Oliveira-Costa, J.; Resende, J. A.; Gomes, M. A. Prevalência de *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* em amostras fecais de um laboratório privado na grande Belo Horizonte. Semana de Iniciação Científica da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, **2006**.
- Ortiz-Ortiz, L; Zamacona, G; Sepúlveda, B; Capin, NR. Cell-mediated immunity in patients with amebic abscess of the liver. *Clin Immunol Immunopathol*, 4:127-34, **1975**.
- Pai, HH; Ko, YC; Chen, ER. Cockroaches (*Periplaneta Americana* and *Blattella germanica*) as potential mechanical disseminators of *Entamoeba histolytica*. *Acta Tropica*, 87(3):355-9, **2003**.
- Pal, S; Sengupta, K; Manna, B; Sarkar, S; Bhattacharya, S; Das, P. Comparative evaluation of somatic and excretory-secretory antigens of *Entamoeba histolytica* in serodiagnosis of human amoebiasis by ELISA. *Indian J Med Res*, 104:152-6, **1996**.
- Parija, SC & Karki, BM. Detection of circulating antigen in amoebic liver abscess by counter-current immunoelectrophoresis. *J Med Microbiol*, 48(1):99-101, **1999**.
- Petri, W.A.; Jackson, T.F.; Gathiram, V.; Kress, K.; Saffer, L.D.; Snodgrass, T.L.; Chapman, M.D.; Keren, Z.; Mirelman, D. Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. *Infect Immun.*, 58(6):1802-1806, **1990**.
- Petri, WA; Haque, R; Iyerly, D; Vines, RR. Estimating the impact of amebiasis on health. *Parasitol Today*, 16(8):320-1, **2000**.
- Pham, VL; Duong, MH; Pham, NH. Amebic abscess of the liver: ultrasound guided puncture. *Am Chir*, 50:340-3, **1996**.
- Phipps, RP; Stein, SH; Roper, RL. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol Today*, 12:349-52, **1991**.

- Pinheiro, S. M. B.; Carneiro, R. M.; Aça, I. S.; Irmão, J. I.; Moaris Jr, M. A.; Coimbra, M. R. M.; Carvalho Jr, L. B. Determination of the prevalence of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in the Pernambuco State of Northeastern Brazil by a polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, 70(2):221-224, **2004**.
- Prasad, R; Tola, M, Bhattacharya, S; Sharma, MP; Bhattacharya, A. Recognition of Entamoeba histolytica lipophosphoglycan by a strain-specific monoclonal antibody and human immune sera. *Mol Biochem Parasitol*, 56:279-87, **1992**.
- Proctor, EM. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Lab Med*, 11(4):829-59, **1991**.
- Que, X & Reed, SL. The role of extracellular cysteine proteinases in pathogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. *Parasitol Today*, 13(5):190-4, **1997**.
- Que, X & Reed, SL. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev*, 13(2):196-206, **2000**.
- Ravdin, JI; John, JE; Johnston, LI; Innes, DJ; Guerrant, RL. Adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites to rat and human colonic mucosa. *Infect Immun*, 48(2):292-7, **1985**.
- Ravdin, JL. Amebiasis. *Clin. Infect. Dis.*, 20(6):1453-66, **1995**.
- Reed, SL; Wessel, DW; Davis, CE. *Entamoeba histolytica* infection and AIDS. *Am. J. Med.*, 90(2):269-71, **1991**.
- Reeves, RE. Metabolism of *Entamoeba histolytica* Schaudinn 1903. *Adv. Parasitol.*, 23:105-42, **1984**.
- Restrepo, MI; Restrepo, Z; Elsa Villareal, CL; Aguirre, A; Restrepo, M. Diagnostic tests for amoebic liver abscess: comparison of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and counterimmunoelectrophoresis (CIE). *Rev Soc Bras Med Trop*, 29(1):27-32, **1996**.
- Rico, G; Diaz-Guerra, O; Gimenez-Scherer, JA; Kretschmer, RR. Effect of the Monocyte Locomotion Inhibitory Factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon the respiratory burst of human leukocytes. *Arch Med Res*, 23(2):157-9, **1992**.
- Rico, G; Leandro, E; Rojas, S; Gimenez, JA; Kretschmer, R. The effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon nitric oxide production by human leukocytes. *Arch Med Res*, 31(Suppl 4):S90-1, **2000**.
- Rivera, WL & Kambara, H. Detection of *Entamoeba dispar* DNA in macaque feces by polymerase chain reaction. *Parasitol Res*, 85(6):493-5, **1999**.
- Rollins, SA; Zhao, Z; Ninomiya, H; Sims, PJ. Inhibition of homologous complement by CD59 is mediated by a species-specific recognition conferred through binding to C8 within C5b-8 or C9 within C5b-9. *J Immunol*, 146(7):2345-51, **1991**.
- Rosenberg, I; Bach, D; Loew, LM; Gitler, C. Isolation, characterization and partial purification of a transferable membrane channel (amoebapore) produced by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*, 33(3):237-47, **1989**.
- Rosenthal, B; Mai, ZM; Caplivski, D; Ghosh, S; de la Vega, H; Graf, T; Samuelson, J. Evidence for the bacterial origin of genes encoding fermentation enzymes of the amitochondriate protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Bacteriol.*, 179(11):3736-45, **1997**.

- Roy, S; Kabir, M; Mondal, D; Ali, IK; Petri, WA; Haque, R. Real-time-PCR assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Microbiol*, 43(5):2168-72, **2005**.
- Sambrook, A.P.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor laboratory Press, N.Y., **1989**.
- Salata, RA; Pearson, RP; Ravdin, JI. Interaction of human leukocytes and *Entamoeba histolytica*: killing of virulent amebae by the activated macrophage. *J Clin Invest*, 76(2):491-9, **1985**.
- Salata, RA; Martinez-Palomo, A; Canales, L; Murray, HW; Treviño, N; Ravdin, JI. Suppression of T-lymphocyte responses to *Entamoeba histolytica* antigen by immune sera. *Infect Immun*, 58:3941-6, **1990**.
- Salles, JM; Moraes, LA; Salles, MC. Hepatic Amebiasis. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 7:96-110, **2003**.
- Santana, Arany. Salvador: a luta pela reparação dos negros. *Estudos Avançados*, 18(50): 147-52, **2004**
- Santos, FLN; Cerqueira, E.J.L.; Soares, NM. Comparison of the thick smear and Kato-Katz techniques for diagnosis of intestinal helminth infections. *Rev Soc Bras Med Trop*, 38(2):196-8, **2005**.
- Santos, FLN; Hiltner, AN; Araújo, FG; Ferreira, MG; Faro, LB. Prevalência e perfil epidemiológico das enteroparasitoses em Salvador (BA). In: 40^o Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial, 2006, Curitiba-PR.
- Sargeant, P.G. A survey of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* (Brumpt) infections on Mahe, the Seychelles. *Arch Med Res*, 23(2):265-267, **1992**.
- Sargeant, PG; Williams, JE. A study of intestinal protozoa including non-pathogenic *Entamoeba histolytica* from patients in a group of mental hospitals. *Am J Public Health*, 72(2):178-80, **1982**.
- Schmerim, MJ; Gelston, A; Jones, TC. Amebiasis. An increasing problem among homosexuals in New York City. *JAMA*, 238(13):1386-7, **1977**.
- Séguin, R, Keller, K; Chadee, K. *Entamoeba histolytica* stimulates the unstable transcription of c-fos and tumor necrosis factor- α messenger RNA by protein kinase C signal transduction in macrophages. *Immunology*, 86:49-57, **1995**.
- Seydel, KB; Li, E; Swanson, PE; Stanely, SL. Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis. *Infect Immun*, 65(5):1631-9, **1997**.
- Sexton, DJ; Krogstad, DJ; Spencer, HC; Healy, GR; Sinclair, S; Sledge, CE; Schultz, MG. Amebiasis in a mental institution: serologic and epidemiological studies. *Am J Epidemiol*, 100(5):414-23, **1974**.
- Shandera, WX; Bollan, P; Hashmey, RH; Athey, PA; Greenberg, SB; White, AC. Hepatic amebiasis among patients in a public teaching hospital. *South Med J*, 91(9):829-37, **1998**.
- Silva, E.F. Studies on *Entamoeba moshkovskii* Tshalaia, 1941. I. Isolation in some areas of the State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 10(6):383-8, **1986**.
- Silva, MC; Monteiro, CS; Araújo, BA; Silva, JV; Povoá, M.M. Determination of *Entamoeba histolytica* infection in patients from Greater Metropolitan Belem, Para, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antigen detection. *Cad Saúde Pública*, 21(3):969-73, **2005**.

- Soares, CA; Oliveira, JB; Brito, MD. Infecção natural por *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 em *Euphractus sexcinctus* (tatu) mantidos em cativeiro. *Arq Bras Med Vet Zoot.*, 52(3):208-9, **2000**.
- Srivastava, G; Anand, MT; Bhattacharya, S; Bhattacharya, A. Lipophosphoglycan is present in distinctly different form in different *Entamoeba histolytica* strains and absent in *Entamoeba moshkovskii* and *Entamoeba invadens*. *J Eukaryot Microbiol*, 42(5):617-22, **1995**.
- Stanley., SL; Zhang, T; Rubin, D; Li, E. Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infect Immun*, 63(4):1587-90, **1995**.
- Stanley, SL. Amoebiasis. *Lancet*, 361(9362):1025-34, **2003**.
- Stenson, WF; Zhang, Z; Riehl, T; Stanley, LS. Amebic infection in the human colon induces cyclooxygenase-2. *Infect Immun*, 69(5):3382-8, **2001**.
- Summary of notifiable diseases, United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 42:1-73, **1994**.
- Tachibana, H; Kobayashi, S; Nagakura, K; Kaneda, Y; Takeuchi, T. Asymptomatic cyst passers of *Entamoeba histolytica* but not *Entamoeba dispar* in institutions for the mentally retarded in Japan. *Parasitol Int*, 49(1):31-5, **2000**.
- Takahashi, T; Gamboa-Dominguez, A; Gomes-Mendez, TJ. Fulminant amebic colitis: analysis of 55 cases. *Dis Colon Rectum*, 40(11):1362-7, **1997**.
- Tannich, E.; Horstmann, R.D.; Knobloch, J.; Arnold, H.H. Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci*, 86(13):5118-22, **1989**.
- Tanyuksel, M; Erguven, S; Tanriover, B; Baylan, O; Gun, H. Comparison of the serologic tests (IFA, ELISA) with microscopy using for the diagnosis of amoebosis. *Acta Parasitol Turc*, 19:476-82, **1995**.
- Tavares, P.; Sansonetti, P.; Guillen, N. Cell polarization and adhesion in a motile pathogenic protozoan: role and fate of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin. *Microbes Infect.*, 2(6):643-9, **2000**.
- Thompson, JE; Forlenza, S; Verma, R. Amebic liver abscess: a therapeutic approach. *Rev Infect Dis*, 7(2):171-9, **1985**.
- Trissl, D; Martínez-Palomo, A; de la Torre, M; de la Hoz, R; Perez, E. Surface properties of *Entamoeba*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strain. *J Exp Med*, 148(5):1137-43, **1978**.
- Troll, H; Marti, H; Weiss, N. Simple differential detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fresh stool specimens by sodium acetate acid formalin concentration and PCR. *J Clin Microbiol*, 35:1701-5, **1997**.
- Valdéz, E; del Carmen Martínez, M; Gomez, A; Cedillo, R; Arellano, J; Perez, ME; Ramos, F; Moran, P; González, E; Valenzuela, O; Melendro, EI; Ramiro, M; Kretschmer, R; Munoz, O; Ximenez, C. HLA characterization in adult asymptomatic cyst passers of *Entamoeba histolytica*/*E. dispar*. *Parasitol Res*, 85(10):833-6, **1999**.
- Valle, PR; Souza, MB; Pires, EM; Silva, EF; Gomes. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA and DNA in *Entamoeba histolytica*. *Rev Inst Med trop Sao Paulo*, 42(5):249-53, **2000**.

- Vanacova, S; Liston, DR; Tachezy, J; Johnson, PJ. Molecular biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Int J Parasitol*, 33(3):235-55, **2003**.
- Vandenberg, N.; van Oorschot, R.A. Extraction of human nuclear DNA from feces samples using the QIAamp DNA Stool Mini kit. *J. Forensic Sci.*, 47(5):93-95, 2002.
- Verweij, JJ; Blotkamp, J; Brienen, EAT; Aguirre, A; Polderman, AM. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* cysts using polymerase chain reaction on DNA isolated from faeces with spin columns. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 19:358-61, **2000**.
- Verweij, JJ; Vermeer, J; Brienen, EA; Blotkamp, C; Laeijendecker, D; van Lieshout, L; Polderman, AM. *Entamoeba histolytica* infections in captive primates. *Parasitol Res.*, 90(2):100-3, **2003**.
- Walderich, B; Weber, A; Knobloch, J. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from German travelers and residents of endemic regions. *Am J Trop Med Hyg*, 57(1):70-4, **1997**.
- Walker, E.L.; Sellards, W.S. Experimental entamoebic dysentery. *Pjillipine J. Sci. B. Trop. Med.*, 8(4):238-253, **1913**.
- Walsh, JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis*, 8(2):228-38, **1986**.
- Walsh, JA. Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. In: Ravdin, J.I., ed. *Amebiasis: human infection by Entamoeba histolytica*. New York: John Wiley and Sons, **1988**: 93-105.
- Wang, W & Chadee, K. *Entamoeba histolytica* alters arachidonic acid metabolism in macrophages *in vitro* and *in vivo*. *Immunology*, 76:242-50, **1992**.
- Wang, W & Chadee, K. *Entamoeba histolytica* suppresses gamma interferon-induced macrophage class II major histocompatibility complex Ia molecule and I-Ab mRNA expression by a prostaglandin E2-dependent mechanism. *Infect Immun*, 63:1089-94, **1995**.
- Wang, W; Keller, K; Chadee, K. Modulation of tumor necrosis factor production by macrophages in *Entamoeba histolytica* infection. *Infect Immun*, 60:3169-74, **1992**.
- Wang, W, Keller, K; Chadee, K. *Entamoeba histolytica* modulates the nitric oxide synthase gene and nitric oxide production by macrophages for cytotoxicity against amoebae and tumour cells. *Immunology*, 83:601-10, **1994**.
- Weinke, T; Friedrich-Jaenicke, B; Hopp, P; Janitschke, K. Prevalence and clinical importance of *Entamoeba histolytica* in two high-risk groups: travelers returning from tropics and male homosexuals. *J Infect Dis*, 161(5):1029-31, **1990**.
- Wilson, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(10):3741-3751, **1997**.
- World Health Organization. Amoebiasis. Report on the WHO/Pan American Health Organization/UNESCO Expert Consultation, Mexico City. Geneva-WHO. *W Epidemiol Rec*, 72:97-100, **1997**.
- Yang, W; Li, E; Kairong, T; Stanley, SL. *Entamoeba histolytica* has an alcohol dehydrogenase homologous to the multifunctional adhE gene product of *Escherichia coli*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 64(2):253-60, **1994**.

- Young, JDE; Young, TM; Lu, LP; Unkeless, JC; Cohn, ZA. Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med*, 156(6):1677-90, **1982**.
- Xanthou, M; Bines, J; Walker, WA. Human milk and intestinal host defense in newborns: an update. *Adv Pediatric*, 42:171-208, **1995**.
- Zengzhu, G; Bracha, R; Nuchamowitz, Y; Cheng-I, W; Mirelman, D. Analysis by enzyme-linked immunosorbent assay and PCR of human liver abscess aspirates from patients in China for *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol*, 37(9):3034-6, **1999**.

9. ANEXOS



TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO



Instituição: Laboratório de Parasitologia Clínica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia. Avenida Barão de Geremoabo, Campus Universitário de Ondina, s/n. Ondina, Salvador-BA.

Projeto: “Implantação de diagnóstico diferencial da infecção causada pela *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* no município de Salvador-BA”.

Pesquisadores Responsáveis: /Dra. Neci de Matos Soares

Fred Luciano Neves Santos

Como voluntário, o Sr. (a) está sendo convidado (a) a participar de uma investigação patrocinada pelo Laboratório de Parasitologia Clínica, Faculdade de Farmácia (UFBA) e pelo Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (FIOCRUZ, Ministério da Saúde), com o objetivo de implantar um diagnóstico diferencial da infecção causada pela *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*. A amebíase é definida como a infecção causada pela *Entamoeba histolytica*. Este protozoário infecta 500 milhões de indivíduos em todo o mundo e é responsável por até 100.000 mortes anuais. O diagnóstico deste parasito é realizado rotineiramente através de microscopia óptica. No entanto, esta metodologia é incapaz de diferenciar a *Entamoeba histolytica* da *Entamoeba dispar*, que são morfologicamente idênticas. Este último habita o intestino, não provocando dano algum ao seu hospedeiro não havendo necessidade, portanto, de tratamento. Este estudo permitirá a implantação de uma metodologia mais eficiente, capaz de diferenciar estas duas espécies, trazendo benefícios aos pacientes por facilitar o diagnóstico e o tratamento. Além disso, permitirá conhecer o perfil epidemiológico da infecção causada pela *Entamoeba histolytica* em Salvador e, conseqüentemente, implantar medidas de controle da infecção.

Se o (a) Sr. (a) concordar em participar deste estudo serão solicitadas algumas informações a respeito de sua saúde. Nós utilizaremos as fezes para concentração dos cistos de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*. Após esta etapa as amebas serão submetidas às seguintes técnicas: extração do DNA genômico e reação em cadeia da polimerase (PCR).

A sua participação neste estudo poderá trazer benefícios imediatos ao seu problema, auxiliando na conduta de seu tratamento, pois os resultados dos testes serão encaminhados para o médico ou próprio paciente.

O (a) Sr. (a) poderá recusar-se a participar do estudo agora, ou em qualquer momento, sem que isto lhe traga qualquer constrangimento ou penalidades da Instituição que está realizando este estudo. **Sua identidade será preservada e nenhum resultado obtido com esta pesquisa conterà seu nome.**

Os pesquisadores responsáveis por este projeto estarão à disposição para esclarecer qualquer dúvida ou questão que o (a) Sr. (a) tenha em relação ao estudo.

Se concordar em participar, por favor, assine abaixo.

Declaro que li este consentimento e que de livre e espontânea vontade, concordei em participar desta pesquisa.

Nome: _____

Assinatura: _____

Salvador (BA): __/__/__

Universidade Federal da Bahia/Fundação Oswaldo Cruz
Laboratório de Parasitologia Clínica
Pós-Graduação em Patologia Experimental

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Nome _____

Idade _____

Bairro onde reside _____

Profissão _____

Sexo

Masculino Feminino

Raça

Branca Mulata

Negra Índia

Amarela

Outra _____

Nível Educacional

Analfabeto 1º Grau

2º Grau 3º Grau

Outra _____

Renda (nº salários mínimos)

> 5 2 – 5

1 – 2 < 1

Outra _____

Consumo de Álcool (etilismo)

Tipo _____

Frequência _____

Fonte de água para consumo caseiro

Poço artesiano Rio

Sistema Público (EMBASA)

Outro _____

Fonte de água para consumo próprio

Filtrada Fervida

Clorada Não tratada

Consumo de vegetais crus

Sim Não

Preparação dos vegetais para consumo

Uso de vinagre Somente água

Hipoclorito de sódio (Q-boa)

Outros _____

Presença de sanitário no domicílio

Sim Não

Utilização de sanitárias

Utiliza latrinas em sanitários públicos

Utiliza latrinas no domicílio

Realiza necessidades ao ar livre

**Número de quartos na
residência** _____

**Presença de sistema de esgoto no
domicílio**

Sim Não

Sistema de coleta regular de lixo

Sim Não

Consistência das fezes no momento da coleta

- Consistentes Diarreicas

Você apresenta alguns dos sintomas abaixo?

- Cólicas intestinais
 Flatulência
 Dores abdominais

Qual motivo o motivo que levou o (a) Sr (a) a procurar o médico?
