The background of the slide is a microscopic image showing several large, pear-shaped trophozoites of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar. These organisms have a distinct outer membrane and a granular cytoplasm. Some trophozoites contain ingested red blood cells, which appear as small, dark, refractile bodies. The trophozoites are scattered across the field of view, with some appearing in small groups and others as single organisms.

Elisa Neves Vianna

**Avaliação da técnica de PCR no diagnóstico
diferencial entre *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba
dispar* em amostras fecais provenientes de pacientes
brasileiros.**

Belo Horizonte-MG

2006

Elisa Neves Vianna

Avaliação da técnica de PCR no diagnóstico diferencial entre *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* em amostras fecais provenientes de pacientes brasileiros.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia
Orientadora: Maria Aparecida Gomes
Co-Orientador: Edward Félix Silva

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

2006

Ao meu pai Sebastião Vianna, um grande artista que sempre me apoiou e incentivou na arte de fazer ciência

*Em memória de minha mãe Maria de Lourdes,
outra maravilhosa artista que foi sempre a
orientação dos meus caminhos*

Agradecimento especial:

Ao programa de pós-graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais pela grande oportunidade oferecida, pela inestimável formação acadêmica, pelo incentivo e pela confiança depositados em cada aluno que nesta casa chega, o meu eterno obrigado.

Em primeiro Lugar a Deus, minha divina, onipotente, onipresente e eterna inspiração e à São Jorge, meu santo protetor que sempre esteve ao meu lado me protegendo, iluminando e abençoando nesta fase da minha vida;

A Prof.^a Cidinha pela imensa oportunidade oferecida, pela confiança, pelo incentivo, cobranças, apoio, conselhos, pela parceria profissional e eterna amizade e carinho;

Ao Prof. Edward Félix Silva pela co-orientação, amizade, carinho e oportunidades oferecidas;

A todos os professores do Departamento de Parasitologia pelos valiosos conselhos, apoio, incentivo, amizade recebidos, pela formação e grande cobrança que nos faz avançar mil anos em dois no âmbito profissional;

Aos professores Alan Lane de Melo, Marcos Horácio, Élide Rabelo, Érika Braga, Norma Melo, Ricardo Wagner, e Mariângela Carneiro pela confiança, apoio intelectual e profissional;

Ao prof. Álvaro Eduardo Eiras pelo carinho e amizade;

Ao prof. Jorge Luis Pesquero do departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG pelo apoio, conselhos, carinho e amizade;

Aos colegas e amigos presentes e aos que passaram pelo laboratório de Amebíase deixando sua marca. Obrigada pelo carinho, apoio e incentivo que sempre facilitaram a caminhada: João, Edna, Marinete, Michele, Cíntia, Sílvio, Haendel, Vítor, Juliana, Paulinha, Flora e Adriana;

O meu agradecimento especial ao João e à Edna pelo imenso carinho, conhecimentos passados e sempre prontidão para o trabalho, sem estas pessoas de suma importância este estudo não haveria se realizado;

A minha querida família Vianna e Neves: meu lindo pai, à maravilhosa Ritinha, aos meus irmãos Marcus e Andersen, às minhas tias fofíssimas Inês e Edneé, a todos meus primos e primas, em especial a Nanda, Inezinha, André, Samuel, Hugo, Bruna e Carol. Obrigado por existirem na minha vida, pelo carinho e amor sempre oferecidos e imenso apoio em cada degrau alcançado na minha vida profissional! Aos meus queridos amigos da PUC, da vida e para toda a vida: Mirinha, Fernanda, Felipe, Débora, Luciana, Rafa, João, Carlos, Karininha, Brenda e Fernando, o meu amor e carinhos eternos. Aos não citados o meu mesmo carinho e gratidão;

Às eternas amigas Eduísa (à sua família) e Estefânia pela alegria intensa, imensa amizade e carinho;

Aos colegas de mestrado de turmas passadas que sempre estiveram presentes proporcionando apoio: Veruska, Karina, Ceres, Rodrigo, Lívio;

A secretaria do Programa de pós-graduação, a Sumara pelo imenso afeto doado a todos os estudantes e compreensão;

A CAPES pela bolsa de estudos concedida por 1 ano, facilitando o caminho;

Aos novos amigos e colegas do Mestrado e do laboratório de Entomologia pela alegria, carinho, apoio, e companheirismo nesta fase que nos leva ao cume da montanha: Vânia, Juliana, Michel, Carol, Andrey, Haendel, Bárbara, Sílvia, Daniel, Eveline, Marcelle e Mateus “Robinho”;

Aos queridos e eternos amigos do mestrado pelo inestimável apoio nos momentos mais difíceis como também nos outros, pela cobrança, carinho, amor, sempre prontidão e alegrias infindáveis: Carol, Vânia, Andrey e Michel;

E por fim às lindas e bailarinas amebas, amei conhecer o “eu interior” de vocês. Obrigada por existirem!

*“Um grito de estrela
vem do infinito
e um bando de luz
repete o grito*

*todas as cores
e outras mais
procriam flores astrais*

Um verme passeia na lua cheia”

(João Ricardo & João Apolinário, 1974)

Resumo

A identificação de infecções por *Entamoeba histolytica* constitui assunto prioritário em amebíase desde que a *E. dispar* foi reconhecida como espécie em 1997 pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A *E. histolytica* é a única ameba no intestino humano que invade os tecidos, produzindo no indivíduo infectado graus de morbidade variados, que se não prontamente diagnosticado e tratado pode ser fatal. A *E. dispar* é considerada uma espécie comensal e o tratamento com imidazólicos é dispensável. As diversas taxas de prevalência da infecção relatadas na literatura em sua grande maioria foram obtidas antes do reconhecimento desta nova espécie de *Entamoeba*, existindo a necessidade da padronização de novas técnicas de diagnóstico a fim de se diferenciar as duas espécies.

Entre os diversos métodos moleculares de diagnóstico, a PCR é tida como uma técnica altamente sensível e específica. Neste trabalho avaliamos a aplicabilidade da PCR como método diagnóstico de infecções por *E. histolytica* e *E. dispar*.

A PCR foi comparada à microscopia e a técnica de ELISA para coproantígenos. Verificamos uma sensibilidade menor da PCR quando comparados aos métodos de microscopia (69.811%) e de ELISA (64.286%). No entanto estes resultados podem estar relacionados ao modelo tomado como padrão, a microscopia ótica e o ELISA. A microscopia ótica depende muito da experiência do microscopista, culminando

principalmente, em resultados falso positivos. Tomando como padrão o perfil de zimodemas foi obtida uma concordância de 100%

Experimentalmente, a técnica de ELISA para coproantígenos mais sensível apresenta resultados positivos com no mínimo 100 trofozoítos por poço. A PCR é capaz de identificar menos que um trofozoíto.

Estes resultados sinalizam para a superioridade da PCR como método diagnóstico e estimulam a continuidade de estudos envolvendo sua padronização e otimização.

SUMÁRIO

1 Introdução	1
1.1 Histórico	1
1.2 Morfologia do parasito	4
1.3 Biologia do parasito	5
1.4 Amebíase	8
1.5 Patogenia e sintomatologia	10
1.6 Epidemiologia e distribuição geográfica	12
1.7 Diferenças moleculares entre <i>E. histolytica</i> e <i>E. dispar</i>	14
1.8 Diagnóstico	17
1.8.1 Clínico	17
1.8.2 Diagnóstico Laboratorial	17
1.8.2.1 Morfologia	17
1.8.2.2 Isoenzimas	21
1.8.2.3 Sorologia	22
1.8.2.4 Coproantígenos	23
1.8.2.5 PCR	25
1.9 Inibidores da técnica de PCR em amostras fecais	30
2 Justificativa	31
3 Objetivo Geral	32
3.1 Objetivos Específicos	32
4 Material e Métodos	33
4.1 Amostras	33
4.1.1 Controle Positivo e Negativo	36
4.2 Reação em Cadeia da Polimerase	36
4.2.1 Escolha do alvo a ser amplificado	36
4.2.2. Visualização dos produtos da PCR	37
4.3 Padronização e otimização da PCR	38
4.3.1 Conservantes fecais e tempo de acondicionamento das amostras	38

4.3.2	Extração de DNA _____	39
4.3.2.1	Método de Sanuki <i>et al.</i> , (1997) _____	39
4.3.2.2	Método de Aguirre <i>et al.</i> (1995) _____	40
4.3.2.3	DNA stool minikit QIAamp (QIAGEN®) _____	40
4.3.2.4	Lise Alcalina (Sambrook <i>et al.</i> , 1989) _____	41
4.3.3	Sensibilidade da PCR _____	42
4.3.4	Especificidade da PCR _____	42
4.3.5	Procedência da Taq DNA polimerase e Estringência da reação. _____	43
4.4	Correlação entre PCR, Zimodema, Coproantígenos e Microscopia ótica. ____	43
4.5	Inibição da PCR por substâncias presentes nas fezes _____	45
5	Resultados _____	46
5.1	Alvo para a PCR _____	46
5.2	Padronização e Otimização da PCR _____	47
5.2.1	Conservantes fecais e tempo de acondicionamento das amostras _____	47
5.2.2	Métodos de extração de DNA _____	48
5.2.3	Sensibilidade da PCR _____	50
5.2.4	Especificidade da PCR _____	50
5.2.5	Procedência da Taq DNA polimerase e estringência da reação _____	51
5.3	Correlação entre PCR, Zimodema, Coproantígenos e Microscopia ótica ____	52
5.4	Inibição da PCR por substâncias presentes nas fezes _____	57
6	Discussão _____	58
7	Conclusões _____	74
	Referências Bibliográficas _____	75
	ANEXOS _____	88

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Cisto de <i>E. histolytica/E. dispar</i> em sedimento fecal humano corado com lugol.....	7
FIGURA 2:	Trofozoíto de <i>E. histolytica/E. dispar</i> em sedimento fecal humano, corado com tricrômio de Wheatley.....	7
FIGURA 3:	Ilustrações exibindo as características morfológicas das diversas espécies de <i>Entamoeba</i> existentes no intestino grosso humano.....	20
FIGURA 4:	Gel de poliacrilamida 4% corado pela prata, mostrando os fragmentos de 310 pb resultantes da amplificação do gene da SSU rDNA.....	46
FIGURA 5:	Efeito de conservantes na amplificação do fragmento de 310 pb do gene SSU rDNA em cepas de <i>E. histolytica</i>	47
FIGURA 6:	Eletroforese em gel de poliacrilamida 4% mostrando produtos de amplificação do fragmento de 310 pb do gene SSU rDNA para <i>E. dispar</i> em três amostras fecais. Mostra-se produtos obtido do DNA extraído pelo método de Lise Alcalina e o mesmo material com DNA extraído pelo kit QIAamp.....	49
FIGURA 7:	Eletroforese em gel de poliacrilamida 4% mostrando os produtos amplificados na PCR para o gene SSU rDNA em quantidades crescentes de trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	50
FIGURA 8:	Eletroforese em gel de poliacrilamida 4% mostrando o desempenho de 3 diferentes marcas comerciais de <i>Taq</i> DNA Polimerase na PCR para identificar <i>E. dispar</i> em amostras fecais.....	51
FIGURA 9:	Eletroforese em gel de poliacrilamida 4% corado pela prata em amostras fecais submetidas à de PCR para amplificar o gen do SSU rDNA e o gen HLA-DRB.....	57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	Cepas de <i>Entamoeba histolytica</i> e <i>E. dispar</i> utilizadas neste estudo com seus respectivos meios cultivo, caracterização clínica e molecular.....	35
TABELA 2:	Cepas de <i>Entamoeba histolytica</i> e <i>E. dispar</i> identificadas pelo padrão de Zimodemas e pela PCR.....	52
TABELA 3:	Resultados comparativos dos exames a microscopia ótica, da pesquisa de antígenos (ELISA) e da PCR em amostras fecais.....	53
TABELA 4:	Resultados comparativos da Microscopia ótica, e da PCR para o gen do rDNA para 90 amostras fecais procedentes de Manaus-AM, Belém-PA, e da Grande Belo Horizonte.....	54
TABELA 5:	Concordância, sensibilidade, especificidade da PCR para o rDNA em relação à microscopia ótica.....	55
TABELA 6:	Concordância, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da PCR para o rDNA em relação ao teste de ELISA (<i>Entamoeba histolytica</i> II Test- TechLab®).....	56

1 – Introdução

1.1 – Histórico

As infecções intestinais foram relatadas desde a Grécia antiga, pelo grande filósofo e médico Hipócrates 460-377 a.C que fez a primeira referência a uma “doença mortífera” que acometia indivíduos que possuíam febre e disenteria (TANYUSKEL & PETRI, 2003).

Apenas em 1875, Fedor Aleksandrovich Lösch em certos estudos microscópicos e clínicos, associou disenteria à presença de trofozoítos amebóides em fezes os quais denominou de *Amoeba coli*. Koch (1887), descreveu pela primeira vez a invasão de tecidos por amebas semelhantes às descritas nos estudos de Lösch (1875). A descrição patológica da invasão amebiana no fígado e no intestino foi feita por Councilman & Lafleur (1891), que pela primeira vez utilizaram as expressões disenteria amebiana e abscesso hepático amebiano. Estes autores descreveram detalhadamente esta ameba que foi considerada responsável pela patologia, e nomearam-na de *Entamoeba dysenterie*.

Schaudinn (1903), descreveu outra espécie de ameba no intestino humano, a *Entamoeba coli*. Esta ameba não foi associada a nenhuma patologia. Este mesmo autor renomeou a *E. dysenterie* como *E. histolytica*, baseando-se na sua extraordinária habilidade de lisar tecidos. Craig (1905) observou que o nome *Entamoeba dysenterie* de Councilman & Lafleur (1891) era prioritário sobre *Entamoeba histolytica*. Nesse período houve várias denominações às amebas que colonizavam o intestino humano,

havendo controvérsias em relação ao nome científico do parasito. Walker (1911) redescreveu as amebas que colonizavam o intestino humano, confirmando a denominação *Entamoeba histolytica* e distinguindo-a da *Entamoeba coli*, com base na identificação do número de núcleos dos cistos das duas espécies.

Em 1925, Emile Brumpt propôs a existência de duas espécies do gênero *Entamoeba* que eram semelhantes na sua morfologia, infectando o homem, sendo uma patogênica e a outra não-patogênica, visto que muitas pessoas aparentemente infectadas com *Entamoeba histolytica* nunca desenvolviam sintomas e espontaneamente livravam-se da infecção. Com base no estudo da patogenicidade das duas espécies em humanos e experimentalmente em gatos jovens, Brumpt, denominou a espécie não patogênica como *Entamoeba dispar*. Entretanto, pelo fato de os caracteres morfológicos entre essas duas espécies serem idênticos, a idéia não foi bem aceita entre os pesquisadores da época.

Diamond em 1961 (DIAMOND, 1968) estabilizou pela primeira vez culturas axênicas de *Entamoeba histolytica*, permitindo posteriores estudos de caracterização bioquímica e imunológica. Em 1978, Sargeant diferenciou isolados patogênicos e não patogênicos de *Entamoeba histolytica* através de diferentes padrões eletroforéticos de isoenzimas.

Clark & Diamond (1993), considerando evidências bioquímicas, imunológicas e genéticas que distinguiam amebas isoladas de indivíduos sintomáticos e assintomáticos, reescreveram a espécie *E. histolytica*. No seminário sobre amebíase,

realizado no México em 1997, pesquisadores da área e a OMS se reuniram e foi confirmada enfim, a existência da *E. dispar* (WHO, 1997).

1.2 – Morfologia do parasito

Entamoeba histolytica apresenta trofozoítos com tamanho variando de 20 a 40 µm de diâmetro, podendo chegar até 60µm em lesões invasivas. O parasito apresenta um único núcleo, e freqüentemente há hemácias englobadas presentes no citoplasma, sendo menos freqüente a presença de leucócitos e bactérias (DIAMOND & CLARK, 1993; RAVDIN, 1995). Possui ribossomos arranjados em hélice formando agregados em barras alongadas com pontas arredondadas, denominados como corpos cromatóides (DIAMOND & CLARK, 1993). O protozoário não apresenta mitocôndria, retículo endoplasmático rugoso ou complexo de Golgi (DIAMOND & CLARK, 1993). O núcleo apresenta cromatina periférica com cariossoma esférico (0.5 µm de diâmetro) freqüentemente localizado em posição central. Os cistos são esféricos com cerca de 10 a 16 µm de diâmetro, apresentando de um a quatro núcleos (quatro, quando maduros), glicogênio como reserva energética em um vacúolo distinto no cisto imaturo, tornando-se difuso nos cistos maduros (DIAMOND & CLARK, 1993). A parede celular dos cistos é composta de quitina, um polímero de N-acetyl-D-glicosamina. (RAVDIN, 1995).

1.3 – Biologia do parasito

Os humanos são caracterizados como reservatório principal da *E. histolytica*/*E. dispar*. No entanto, macacos da família Cebidae e Callitrichidae, tatus e tamanduás podem ser encontrados infectados (VERWEIJ *et al.*, 2003, SOARES *et al.*, 2000). O complexo de espécies já foi encontrado também em fezes de cães e gatos, sugerindo a possibilidade de transmissão zoonótica da doença, não existindo, porém nenhum caso comprovado na literatura (TANYUSKEL & PETRI, 2003).

A transmissão da doença ocorre através da via oral-fecal, pela ingestão de alimentos contaminados com resíduos fecais contendo cistos e pode ocorrer através do contato sexual oral-anal (MORAN *et al.*, 2005). Artrópodes como *Periplaneta americana*, *Blatella germanica* e moscas de variadas espécies se caracterizam como vetores mecânicos de cistos do parasito (PAI *et al.*, 2003).

O ciclo biológico do parasito é marcado pela existência de dois estágios, o estágio infectante que seria o de cisto e o estágio de multiplicação de trofozoítos na luz do intestino grosso. Cistos maduros do parasito são ingeridos pelo hospedeiro, passam pelo estômago e chegam ao intestino delgado na porção terminal do íleo. Neste local há o desencistamento de oito trofozoítos resultantes da divisão mitótica da célula do cisto. Estes trofozoítos são levados através do bolo alimentar até o intestino grosso, na parede da mucosa do cólon transversal ficam aderidos e se nutrem de bactérias e células. Certos trofozoítos aderidos na parede intestinal se destacam da mesma, transformando-se em pré-cistos que contém apenas um núcleo e após tornarem-se

maduros se caracterizam pela presença de quatro núcleos. Nas fezes diarréicas pode-se encontrar pré-cistos e trofozoítos, nas fezes pastosas pré-cistos e cistos maduros e nas fezes formadas cistos maduros (TANYUSKEL & PETRI, 2003).

Os cistos no ambiente podem viver por semanas ou meses principalmente em condições úmidas. À temperaturas menores que 5°C e maiores que 40°C são rapidamente degenerados (TANYUSKEL & PETRI, 2003).



Figura 1: Cisto de *E. histolytica*/*E. dispar* em sedimento fecal humano corado com lugol.
FONTE: <www.cdc.gov>

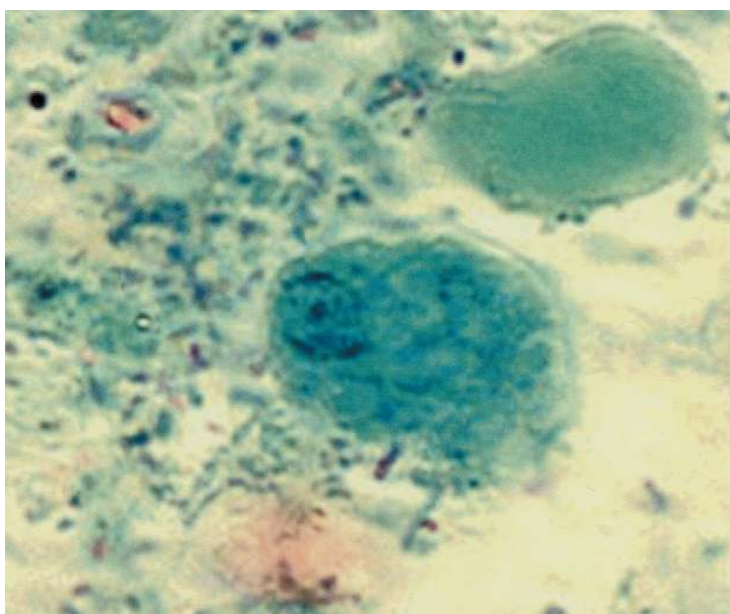


Figura 2: Trofozoítio de *E. histolytica*/*E. dispar* em sedimento fecal humano, corado com tricrômio de Wheatley. Aumento de x 800. Notar o núcleo arredondado e o cariossoma central.
FONTE: Stanley, 2003.

1.4 – Amebíase

A amebíase é definida como a infecção causada pelo protozoário parasita *Entamoeba histolytica* que pode produzir manifestações clínicas ou não (WHO, 1997). O parasito normalmente reside no intestino grosso, podendo penetrar ocasionalmente na submucosa deste órgão e alcançar através do sistema porta venoso, o fígado, causando lesões necróticas e disseminando-se para outros órgãos. A patologia acarretada pelo parasita é responsável por mais de 100.000 mortes ao ano, ocupando o segundo lugar em termos de mortalidade por protozoários (WHO, 1997). Em Bangladesh, onde a amebíase é sério problema de saúde pública, doenças diarréicas são a maior causa de morte em crianças com um índice de mortalidade de 30% (PETRI *et al.*, 2000).

Vários fatores podem contribuir para o desenvolvimento da doença sendo estes intrínsecos do hospedeiro como a microbiota intestinal, dieta alimentar, status imunológico, sexo, idade e fatores do parasito, dependente do grau de virulência de cepas de *E. histolytica* (GOMES *et al.*, 2000; STANLEY, 2003)

A amebíase é classificada como a infecção sintomática ou assintomática do homem pelo protozoário *E. histolytica*. Desde a descrição da *E. dispar*, não é conhecida a real percentagem de indivíduos assintomáticos e sintomáticos. Indivíduos assintomáticos podem estar infectados tanto com *E. histolytica* quanto com *E. dispar*. Estima-se que a infecção por *E. dispar* seja cerca de 3 vezes mais freqüente que por *E. histolytica* (HAQUE *et al.*, 1999; PINHEIRO *et al.*, 2004;). Contudo esta estimativa considera dados

coletados de diagnósticos moleculares ainda em fase de padronização, não havendo um método molecular padronizado e utilizado unanimemente para diagnóstico, sobretudo epidemiológico.

Indivíduos sintomáticos podem estar infectados tanto com *E. histolytica* quanto com *E. dispar*. A forma clínica de colite disentérica e necrose coliquativa do fígado são produzidas somente pela *E. histolytica* (WHO, 1997). A forma clínica de colite não disentérica, muito comum em nosso país, pode ser causada por *E. dispar* ou *E. histolytica* (GOMES *et al.*, 2000). Os sintomas da colite não-disentérica não são patognomônicos da amebíase e podem ser confundidos com os de outras doenças como, por exemplo, a Síndrome do Cólon Irritável. Assim a *E. dispar* pode não ser responsável pela manifestação clínica. O diagnóstico diferencial entre as espécies direciona a terapia (WHO, 1997).

1.4.1 – Patogenia e sintomatologia

A patogenia pode ser definida como eventos celulares e outros mecanismos que ocorrem no desenvolvimento de uma doença (RAVDIN, 1989). O mecanismo inicial para o evento seria a ligação de alta afinidade que a lectina de superfície da *Entamoeba histolytica*, Gal/GalNAC (lectina ligante a galactose / N-acetil-d-galactosamina) possui em relação à receptores existentes nas mucinas das células epiteliais do intestino humano (PETRI *et al.*, 1990; RAVDIN, 1989;). A partir da ativação do ‘programa’ de virulência da ameba, proteínas denominadas de amebaporos são secretadas pelo parasito promovendo a formação de poros nas membranas das células-alvo (STANLEY, 2003). Cisteíno-proteinases são secretadas pela ameba, provocando a quebra de MUC2 (apoproteína mucina 2), o maior componente do muco, além de mediar a proteólise das células calciformes (HUSTON, 2004). Proteases como Catepsina-B são adicionalmente secretadas pelo parasito, tendo um papel na degradação de proteínas relevantes da matriz extracelular, como colágeno tipo I, fibronectina e laminina (HUSTON, 2004). Estes eventos promovem a liberação de interleucinas e outros fatores quimiotáticos pelas células afetadas, havendo o recrutamento de neutrófilos para o local de invasão pelo parasito (STANLEY, 2003). *E. histolytica* possui a capacidade de lisar neutrófilos, contribuindo para um aumento de mediadores da inflamação, causando diarreia e provocando úlceras na mucosa, caracterizando a colite amebiana (STANLEY, 2003).

A colite ou disenteria amebiana afeta cerca de 9% dos indivíduos portadores de infecção por *Entamoeba histolytica*, sendo esta representada por dor abdominal, às

vezes febre e no mínimo 10 evacuações diarréicas mucosanguinolentas diárias caracterizando o estágio agudo da doença. As complicações relacionadas são: colite fulminante, com perfurações das úlceras, ameboma, amebíase cutânea e fístulas reto-vaginais (TANYUSKEL & PETRI, 2003)

Alcançando o sistema porta, *E. histolytica* se instala no fígado, produzindo necrose do órgão (RAVDIN, 1989), representada por lesões únicas no lóbulo direito do fígado em 90% dos casos (SHARMA & AHUJA, 2003). Os sintomas são dor no hipocôndrio direito, febre, hepatomegalia, icterícia e dor irradiando para o ombro direito (HAQUE *et al.*,2000). As complicações decorrem da ruptura do mesmo, a circulação transporta o parasito para o pulmão, podendo neste local formar novo abscesso como adicionalmente na pleura, no pericárdio e até amebíase genito-urinária (TANYUSKEL & PETRI, 2003).

1.4.2 - Epidemiologia e distribuição geográfica

A prevalência da infecção amebiana pode ser maior que 50% em certas regiões de países em desenvolvimento. Estudos sorológicos na cidade do México (CABELLERO-SALCEDO *et al.*, 1994) mostraram que cerca de 9% da população acima de cinco anos estava infectada com *E. histolytica*. Ramos *et al.* (2005) em um estudo em uma comunidade rural no México, encontrou uma prevalência de 11,4% para *E. histolytica* e de 7,2% para *E. dispar*. Mais de 1 milhão de casos de amebíase neste país são notificados com mais de 1000 mortes ao ano (HAQUE *et al.*, 1999)

Taxas altas de infecção podem ocorrer na Índia, África e América do Sul e Central. Em Dhaka, Bangladesh, onde patologias acompanhadas de diarreia são causas principais de mortes em crianças menores de seis anos de idade, cerca de 55% das crianças possuíam sorologia positiva para *E. histolytica* em um estudo prospectivo de dois anos. A incidência anual de colite amebiana foi comparável com a taxa de disenteria causada por *Shigella* nesta coorte sendo de 2% (HAQUE *et al.*, 2002). Em outro estudo na mesma região, a prevalência da infecção por *E. histolytica* em crianças foi de 4,7% (HAQUE *et al.*, 1999)

No Vietnã, Blesmann *et al.* (2002) encontraram uma prevalência de 0,9% para *E. histolytica*, sendo que em 8 anos foram identificados 2.031 casos de abscesso hepático amebiano, indicando uma incidência de pelo menos 21 por 100.000 habitantes ao ano. O risco para abscesso hepático amebiano foi significativamente dependente de idade e sexo, sendo que 95% dos casos atingiam adultos e 80% eram do sexo masculino,

porém títulos de anticorpos anti-lectina Gal/GalNac foram maiores em pessoas do sexo feminino.

Na Venezuela, estudos sorológicos mostraram que nesta região a amebíase seria endêmica, com taxas de 1,8 a 29.5% em áreas urbanas e mais de 20% em comunidades rurais (CHACÍN-BONILLA & BONPART.,1981).

No Brasil, a prevalência do parasito varia entre as regiões. No Amazonas em um estudo recente, Benneton (2003), encontrou uma prevalência do complexo *E.histolytica/E.dispar* de 21,5%, sendo que de *E. histolytica* foi encontrado 1,5%. Em Pernambuco, foi constatada igualmente uma maior prevalência para *E.dispar* sendo esta de 4,1% e 0% para *E. histolytica* (PINHEIRO *et al.* 2004). Silva *et. al.* (2005) encontraram uma prevalência de 29,35% para *E. histolytica* na grande Belém – PA, utilizando o kit da *Entamoeba histolytica* test II[®] da TechLab.

Braga *et al.* (2001) demonstraram uma prevalência 14,9% para *E histolytica* sobre 10,6% para *E. dispar* numa comunidade da periferia de Fortaleza. Estes estudos reforçam a endemicidade do parasito no Nordeste do país, apesar de geralmente não ocorrer doença.

Em países desenvolvidos, ocorrem altas taxas de infecções em homens homossexuais sexualmente ativos, turistas recém chegados de áreas endêmicas, imigrantes, pessoas institucionalizadas como idosos, crianças, deficientes mentais e pessoas portadores do vírus HIV (MORAN *et al.*, 2005, TANYUSKEL & PETRI, 2003)

1.5 – Diferenças moleculares entre *E. histolytica* e *E. dispar*

Evidências moleculares validaram a teoria de Brumpt (1925) com vários trabalhos demonstrando diferenças entre as duas espécies. Dentre estes, Tannich *et al.* (1989), encontraram uma organização diferente do gen da actina para as duas espécies de *Entamoeba*. Através da análise do seqüenciamento de DNA comparação de seqüências de aminoácidos entre os clones de ambos isolados patogênicos e não patogênicos, foi encontrada uma divergência evolucionária de 12%. A hibridização com sondas específicas de cDNA ao DNA genômico de 4 isolados patogênicos e 5 isolados não patogênicos revelou 2 padrões distintos por Southern blot.

Clark & Diamond (1991), utilizaram a técnica de RFLP para diferenciar amplicons da subunidade menor do RNA ribossômico (SSU rRNA) em isolados provenientes de pacientes sintomáticos, caracterizados como cepas patogênicas e de assintomáticos, caracterizados como cepas não patogênicas. A análise do padrão das amostras separou-os em grupos distintos. A seqüência parcial dos genes de três isolados de cada grupo revelou uma distância genética de 2,2% entre os dois grupos. Estas diferenças significativas tanto nas regiões codificadoras do gen do rRNA quanto nas regiões intergênicos, são utilizadas como proposta de diagnóstico molecular mostrado em vários trabalhos (BHATTACHARYA *et al.*, 1998)

A região interna transcrita (região ITS) do rRNA apresenta-se variável em comprimento entre as variadas espécies de *Entamoeba* e possui seqüências altamente conservadas comparadas à outras regiões do rRNA. Srivastava *et al.*, (2005) através da técnica de

'transposon display' utilizou sondas que se ligam a este alvo genético para a diferenciação entre cepas de *E.histolytica*. Nesta região do rRNA existe um retrotransposon de *E. histolytica* bem caracterizado presente em cerca de 500 cópias por célula e totalmente ausente em *E.dispar*. Esta análise molecular utilizou várias cepas de *E.histolytica* derivadas de cultura polixênica. A identificação das espécies por PCR teve como alvo a região ITS-2 e 18S do rRNA, aplicado a fezes positivas para cistos do complexo de espécies concentradas por formol-éter.

Diferenças na seqüência de aminoácidos (5%) e na expressão dos genes de cópia única para a enzima superóxido dismutase foram encontradas nas duas espécies de *Entamoeba* através de seqüenciamento e pela técnica de RFLP (restriction fragment lenght polymorfism) (TANNICH *et al.*, 1991).

Gomes *et al.* (1997) utilizando a técnica de LSSP-PCR (Low-Stringency Single Specific Primer - Polymerase Chain Reaction), demonstraram diferenças entre *E. histolytica* e *E. dispar* através da análise de um fragmento de DNA de um gen estrutural de 482 pb.

Petri *et al.* (1990) diferenciaram cepas patogênicas (*E.histolytica*) e cepas não-patogênicas (*E.dispar*) através de anticorpos monoclonais que são específicos para a lectina de aderência Gal/GalNac existente na superfície da membrana celular das amebas. Esta lectina possui 6 epitopos, dos quais 4, *E.dispar* não possui.

Tachibana *et al.*, (1990) utilizaram anticorpos monoclonais para identificar *E. histolytica*, sendo que estes reagiram com 42 isolados patogênicos e falharam na reação com 14

isolados não-patogênicos. A análise por Western immunoblotting mostrou que o peso molecular do componente antigênico reconhecido pelos anticorpos monoclonais era de 30KDa encontrado exclusivamente em isolados patogênicos com diferentes perfis de zimodemas.

1.6 – Diagnóstico

1.6.1 – Clínico

Sintomas comuns a outras infecções gastrointestinais e o poliparasitismo levam a necessidade de confirmação da suspeita da infecção por amebas. Os sintomas sendo não específicos são confundidos facilmente com Shigelose (*S. dysenteriae* e *S. flexneri*) e com um número de outras disenterias bacterianas como infecções por *Salmonella*, *Campylobacter* ou *Escherichia coli* (TANYUSKEL & PETRI, 2003).

1.6.2 – Diagnóstico Laboratorial

1.6.2.1 – Morfologia

Para o diagnóstico da infecção por *E. histolytica*/*E. dispar*, historicamente tem sido escolhido a microscopia ótica. Apenas um exame microscópico não é recomendado para o diagnóstico de amebíase luminal, (DOGANCI *et al.*, 2004) e vários fatores podem contribuir para afetar os resultados da microscopia ótica. A falta de microscopistas bem treinados seria um destes fatores, que teria como consequência resultados falso-positivos ou falso-negativos. Pode existir a dificuldade em se diferenciar trofozoítos não-móveis de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e células de tecidos (TANYUSKEL & PETRI, 2003).

Outros fatores relacionados à falha na microscopia ótica seriam o tempo de entrega da amostra fecal ao laboratório e condições de coleta inadequadas como recipientes contaminados ou coleta das amostras fecais diretamente do solo. Algumas drogas ou alguns medicamentos podem igualmente interferir no exame como antibióticos, laxativos, antiácidos, catárticos (sulfato de magnésio), preparações antidiarréicas (kaolina ou bismuto). Outro problema é a eliminação intermitente de cistos, havendo necessidade de se concentrar material de três coletas em dias alternados, visando diminuir resultados falsos negativos (TANYUSKEL & PETRI, 2003)

O diagnóstico de fezes diarréicas prevê a identificação de trofozoítos. A presença de hemácias em seu citoplasma seria um indicativo de infecção por *E. histolytica* (GONZÁLES-RUIZ *et al*, 1994a), no entanto este encontro é raro (TANYUSKEL *et al.*, 2005). Kebede *et al.* (2004) em um estudo de prevalência do parasito na Etiópia, submeteram 108 amostras fecais positivas para trofozoítos com hemácias englobadas, diagnosticadas pela microscopia ótica, a um PCR em tempo real, utilizando como alvo o gen da SSU rRNA (subunidade menor do RNA ribossomal). Setenta e sete amostras foram positivas para *E. dispar* e apenas uma foi positiva para *E. histolytica*, enquanto as 30 restantes foram negativas para qualquer uma das espécies de *Entamoeba*, sugerindo, portanto uma taxa significativa de erro do diagnóstico pela microscopia ótica. O único estudo sistemático que tentou examinar a validade da identificação de trofozoítos com hemácias englobadas pela microscopia ótica foi o de Gonzalez-Ruiz *et al.* (1994a). Neste estudo os autores sugerem que 100% de especificidade pode ser alcançado utilizando este critério microscópico. Porém Kebede *et al* (2004) discutem que este trabalho é oriundo de um laboratório que seria um centro de referência e que

estaria longe de representar uma situação de diagnóstico de rotina em laboratórios de países endêmicos.

A sensibilidade da microscopia ótica é limitada pela inabilidade de diferenciar *E. histolytica* e *E. dispar*. Cistos de outras amebas não patogênicas como *E. hartmanni*, *Endolimax nana*, *Iodameba bütschilii*, além de leucócitos e de uma conservação incorreta das amostras podem causar um diagnóstico errôneo, resultando em falso-positivo (Huston *et al.*, 1999). É possível uma diferenciação entre o complexo *E. histolytica/E. dispar* e outras amebas citadas por coloração em hematoxilina férrica ou com tricrômio em amostras frescas ou conservadas em soluções apropriadas, sendo, este, porém um processo laborioso e demorado. Além deste detalhe, o processo de coloração não pode ser aplicado ao diagnóstico para a diferenciação entre *E. histolytica* e *E. dispar* (RAVDIN, 2000)

Haque *et al* (1995) diagnosticaram *E. histolytica/E. dispar* em 202 amostras fecais através da microscopia ótica e compararam este diagnóstico ao perfil de zimodemas. A microscopia ótica apresentou uma sensibilidade baixa de 60% e especificidade de 79%.

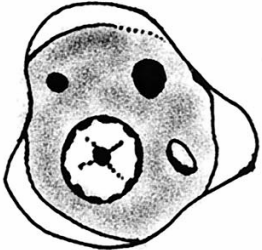

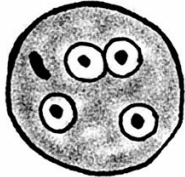
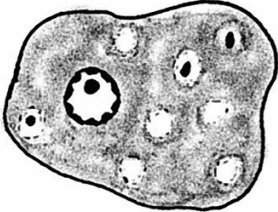
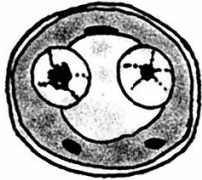
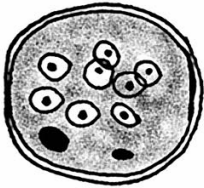
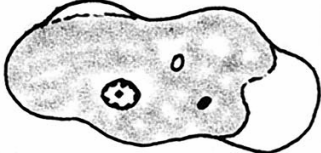


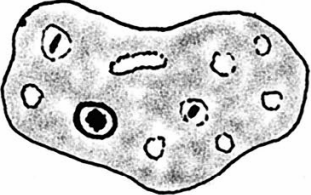
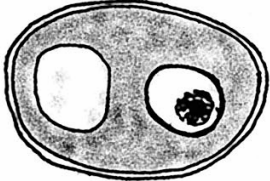
<i>E. histolytica</i> <i>E. dispar</i> <i>E.</i> <i>moshkovskii</i>			
<i>E. coli</i>			
<i>E. hartmanni</i>			
<i>I. bütschlii</i>			
Organismo	Trofozoíto	Pré-Cisto	Cisto

Figura 3: Ilustrações exibindo as características morfológicas das diversas espécies de *Entamoeba* existentes no intestino grosso humano.

FONTE: Tanyuskel & Petri (2003).

1.6.2.2 – Isoenzimas

A análise através de isoenzimas (SARGEAUNT *et al.*, 1978) tem sido realizada em pesquisa básica com mais de 3000 isolados já caracterizados no mundo, como pertencentes a uma espécie ou à outra (HAQUE *et al.*, 1995). Entretanto esta técnica requer várias semanas para ser concluída, necessitando cultivo prévio das amostras. O estabelecimento de culturas de *Entamoeba* não é um processo de rotina e é menos sensível que a microscopia ótica. Este processo seria muito laborioso e complicado, pois há o problema de outras populações de microorganismos ultrapassarem em crescimento a cultura de *E. histolytica* já estabelecida (TANYUSKEL & PETRI, 2003). Falhas no processamento das amostras fecais e tratamento antimicrobiano e/ou antiamebiano dos pacientes antes da obtenção das amostras podem levar a resultados falso-negativos (HAQUE *et al.*, 1998; HUSTON *et al.*, 1999).

Este problema de detecção das espécies referidas de amebas não permite um diagnóstico rápido e preciso da infecção nos países onde a doença é mais prevalente (HUSTON *et al.*, 1999). Prevê-se assim a necessidade do desenvolvimento de métodos mais específicos para o diagnóstico de *E. histolytica* utilizando tecnologias adequadas principalmente para uso países em desenvolvimento (WHO, 1997).

1.6.2.3 – Sorologia

Na sorologia indivíduos assintomáticos e oligossintomáticos geralmente são negativos. No entanto, indivíduos sintomáticos apresentam altos títulos de anticorpos que podem ser reconhecidos em diversas técnicas sorológicas, como Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), ELISA (Enzyme linked Immunosorbent assay) e Hemaglutinação Indireta (HAI) (HUSTON *et al.* 1999). Estes anticorpos, no entanto, não distinguem infecções regressas de atuais (WHO, 1997).

As muitas técnicas sorológicas utilizadas no diagnóstico da amebíase apresentam sensibilidade e especificidade variadas quando comparadas entre si. Póvoa *et al.*, (2000), em um estudo no Pará, comparou métodos imunológicos para o diagnóstico de amebíase intestinal. Os autores observaram uma maior sensibilidade da técnica de ELISA em relação a RIFI.

Silva *et al.*, (1996) utilizaram a técnica de RIFI e HAI para o diagnóstico em soro de pacientes sintomáticos e assintomáticos com amostras fecais positivas pela microscopia para cistos de *E.histolytica/E.dispar*. A RIFI mostrou-se mais sensível que a HAI para o diagnóstico tanto em soros de pacientes sintomáticos como assintomáticos.

1.6.2.4 – Coproantígenos

Esta técnica se baseia na identificação de antígenos específicos da *E. histolytica* por anticorpos monoclonais (PETRI *et al.*, 1990, GONZALEZ-RUIZ *et al.*, 1994b) em amostras fecais ou fluidos de abscesso hepático (JACKSON & RAVDIN 1996; HUSTON *et al.*, 1999). O ELISA que detecta a presença da lectina de aderência Gal/GalNac é uma das técnicas mais utilizadas em diversos trabalhos no campo de diagnóstico da amebíase (AB-ALLA & RAVDIN, 2002; BENNETON, 2003; BRAGA *et al.*, 1998; BRAGA *et al.*, 2001; HAQUE *et al.*, 1995; HAQUE *et al.*, 1999; HAQUE *et al.*; 2000; HAQUE *et al.*, 2002; POVOA *et al.*, 2000; SHARMA *et al.*, 2003, TANYUSKEL *et al.*, 2005)

Uma das técnicas existentes de coproantígenos para a detecção de *E. histolytica* seria o ENZYMEBA test[®], que utiliza anticorpos policlonais contra a cisteína proteinase existente em maior quantidade na cepa HM1:IMSS, a histolysaína. A reação é positiva quando um substrato é adicionado aos poços das placas e se enzima estiver presente, ela reagirá com este, tornando os componentes da reação vermelhos. A leitura do resultado do exame pode então ser vista a olho nu, instantaneamente ou por colorimetria. A sensibilidade do teste relatada foi de 87,5% e a especificidade de 100% em relação à microscopia ótica (LUACES *et al.*, 1993).

González-Ruiz *et al.* (1994b), desenvolveram o denominado FAC-ELISA (ELISA de antígeno fecal de captura), um ELISA de captura que se baseia no uso de anticorpos monoclonais contra um antígeno de massa molecular de 81 e 84 kDa (kilodaltons)

específico para cepa de *E. histolytica* (GONZÁLEZ RUIZ *et al.*, 1992) em pacientes com disenteria amebiana. A sensibilidade da técnica em relação ao perfil de zimodemas foi de 87% e a especificidade foi de 100%.

Para a detecção de coproantígenos existem alguns kits comerciais disponíveis como o *E. histolytica* test[®] (TechLab Inc., Blacksburgh, VA) que detecta a presença de antígenos de *E. histolytica* e o *Entamoeba* test[®] (HUSTON *et al.* 1999; WHO, 1997). O *Entamoeba* test[®] identifica a lectina de aderência Gal/GalNac de *E. histolytica* e *E. dispar*, confirmando um resultado positivo ou negativo para o complexo *E. histolytica/E. dispar*. *E. histolytica* test[®], detecta apenas a presença de antígenos de *E. histolytica*. O kit *E. histolytica* test[®], em relação ao seu nível de detecção informado pelo fabricante é bastante baixo, sendo de 1000 trofozoítos/poço (HAQUE *et al.*, 1993; HAQUE *et al.*, 1995). Os altos níveis de antígenos de *E. histolytica* necessários para a detecção sugerem a inabilidade deste kit de detectar baixo número de parasitos nas amostras, especialmente em indivíduos assintomáticos em áreas de endemicidade que podem estar infectados com ambos tipos de amebas (ACUNA-SOTO *et al.*, 1993).

Merlin Optimum S kit[®] (Merlin Diagnostika, Bornheim-Hersel, Alemanha) detecta o antígeno rico em serina, abundante na membrana de *E. histolytica* (STANLEY *et al.*, 1990). O teste é positivo na presença de aproximadamente 100 trofozoítos de *E. histolytica* por poço. Por outro lado este kit aparenta não ser suficientemente seletivo para distinguir o antígeno rico em serina da *E. histolytica* daquele da *E. dispar*, apresentando reação cruzada em altas concentrações - 100 a 1000 trofozoítos por poço

(MIRELMAN *et al.*, 1997). Esta falha pode causar um diagnóstico errôneo levando a resultados falso-positivos para *E. histolytica* (RAVDIN, 1995; HUSTON *et al.*, 1999).

O Alexon Kit[®] (ProSpectT test, Alexon-Trend, Ramsey, MN) que utiliza anticorpos policlonais, possui nível satisfatório de sensibilidade, detectando 100 trofozoítos/poço de *E. histolytica/E. dispar*, porém não diferencia as duas espécies de amebas (MIRELMAN *et al.*, 1997).

Estes kits além de deixarem a desejar em termos de especificidade e sensibilidade, são ainda muito caros, inviabilizando seu uso corriqueiro em laboratórios de análises clínicas.

1.6.2.5 - PCR

O primeiro trabalho utilizando a PCR para o diagnóstico diferencial entre *E. histolytica* e *E. dispar* diretamente em amostras fecais foi o de Acuna-Soto *et al.* (1993), em um estudo epidemiológico no México. O estudo utilizou um protocolo de extração de DNA relativamente simples e a detecção da positividade da PCR foi verificada através da utilização de sondas em membrana de nitrocelulose, pela técnica de “dot blot” (um método laborioso para ser utilizado na rotina). A sensibilidade e a especificidade da técnica foram altas sendo a primeira de 96% e a segunda de 98%. Houve um caso positivo para o complexo *E. histolytica/E. dispar* à microscopia ótica entre 25 amostras, que não houve amplificação, resultando em falso-negativo. Rivera *et al.* (1996) utilizaram este mesmo procedimento com ligeiras modificações na extração de DNA em

um estudo de 72 amostras fecais nas Filipinas, em 19 destas a PCR foi positiva apenas para *E. dispar* não havendo positividade de nenhuma amostra para *E. histolytica*.

Katzwinkel-Wladarsch *et al.* (1994) padronizaram uma técnica de PCR para a diferenciação entre *E. histolytica* e *E. dispar*, demonstrando a utilidade da técnica com iniciadores específicos para um longo fragmento do gen da SSU rRNA. O procedimento foi aplicado a três amostras positivas para cistos do complexo *E.histolytica/E.dispar* e em amostras fecais negativas acrescidas de algumas cepas de *E.histolytica*.

Aguirre *et al.* (1995) utilizaram em sete amostras fecais positivas para *E. histolytica* ao microscópio ótico, em aspirado de abscesso hepático e em cepas de *E. histolytica* e *E. dispar*, a técnica de PCR –SCHELA (Polymerase chain reaction –solution- hybridization enzyme –linked- immunoassay). Nesta PCR o DNA alvo da reação é hibridizado com sondas marcadas com biotina (ou outro marcador como fluoresceína) e os produtos de amplificação são detectados através de um espectofotômetro, processo este, que substitui eletroforese em gel para posterior execução da técnica de Southern Blotting.

Walderich *et al.* (1997) a fim de padronizarem uma técnica de PCR em amostras fecais, não obtiveram sucesso e padronizaram um procedimento de isolamento de cistos de amostras fecais para purificação destes e posterior uso molecular. Este procedimento consistia em purificação dos cistos em gradientes de sacarose e posterior digestão enzimática de partículas de celulose. As frações de cistos de *E. histolytica* e *E. dispar* foram diferenciadas através do uso de sondas de DNA p145 e B133 construídas por Mirelman *et al.*, 1990.

Sanuki *et al.* (1997) utilizaram uma técnica de extração de DNA simples com iniciadores específicos para *E. histolytica* e *E. dispar* em amostras fecais fixadas em formalina tamponada 10%. A técnica de PCR identificou um número mínimo de 10 cistos e os resultados foram consistentes com dados das amostras submetidos às técnicas de coproantígenos e com o perfil de diferentes zimodemas.

Britten *et al.* (1997) padronizaram um PCR –SCHELA ou PCR colorimétrico para a diferenciação entre *E. histolytica* e *E. dispar* em amostras fecais positivas, inoculadas em meio de cultura. Os autores defendem que o método pode ser executado em um dia e detecta 0,1 trofozoítos de *E. histolytica* e 1 a 10 trofozoítos de *E. dispar* por grama de fezes, ou seja, esta técnica apresenta uma sensibilidade bem alta.

Verweij *et al.* (2000) padronizaram uma técnica de extração de DNA utilizando o kit da QIAamp® (Qiagen, Alemanha) para extração de DNA de tecidos. Neste kit são utilizadas colunas com resinas carregadas positivamente que proporcionam a purificação do DNA. A técnica de PCR-SCHELA de Aguirre *et al.*, (1995) foi executada nas amostras e em apenas 1,7% dos casos houve inibição da PCR. Em 657 amostras não preservadas positivas à microscopia ótica para o complexo *E. histolytica*/*E. dispar* a técnica de PCR mostrou-se positiva em 98,8% destas.

Evangelopoulos *et al.* (2000), desenvolveram um nested-multiplex PCR para a diferenciação entre *E. histolytica* e *E. dispar* em amostras fecais, detectando 10 trofozoítos/50 mg de fezes de *E. dispar* e 50 trofozoítos de *E. histolytica*/50 mg de fezes.

Nuñez *et al.* (2001) descreveram uma técnica de extração em amostras não fixadas, que segundo os autores, evita longo período de incubação de amostras. Esta extração foi feita através da combinação de pérolas de zircônio que rompem os cistos com um tampão de lise, para posterior amplificação através de um multiplex PCR para a diferenciação entre *E. histolytica* e *E. dispar* em amostras fecais. O nível de detecção da PCR mostrou-se baixa, sendo positiva para 100 trofozoítos por 0,5 g de fezes.

Blessmann *et al.* (2002) conseguiram obter um rendimento excelente da PCR em termos de níveis de detecção através da padronização de um PCR em tempo real em amostras fecais para a diferenciação entre *E. histolytica* e *E. dispar*. O trabalho utiliza o DNA stool minikit da QIAamp[®] (QIAGEN[®]) como método de extração a fim de um maior rendimento da técnica, e utilizando iniciadores que amplificam um fragmento de 310 pb contido no gene do SSU rRNA marcados com sondas fluorescentes, a técnica foi capaz de detectar menos de 0.1 parasito por grama de fezes. Amostras fecais contendo outras amebas não amplificaram. No entanto, apesar do custo da execução da PCR ser menor que \$7 dólares por amostra, o aparelho LightCycler, necessário para a execução da PCR em tempo real, é que torna economicamente inviável a utilização da técnica como rotina em países em desenvolvimento.

Verweij *et al.* (2004) padronizaram uma técnica de multiplex-PCR em tempo real para a detecção simultânea de *E. histolytica*, *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum* em amostras fecais. Utilizando como extração o método de Verweij *et al.*, (2000), com a

adição de polivinilpolipirrolidona a 2%, uma substância utilizada para reduzir a ação de inibidores da PCR contido nas fezes, a sensibilidade da técnica para a detecção de *E. histolytica* foi de 100% e o mesmo valor foi encontrado para a especificidade, aplicado a vinte amostras.

Paglia & Visca (2004) utilizaram a técnica de PCR descrita por Evangelopoulos *et al.* (2000) em amostras fecais, provenientes de indivíduos com sintomas gastrointestinais ou que enquadrassem em fatores de risco para a infecção por *E. histolytica/E. dispar* (viajantes ou imigrantes vindos de países tropicais e subtropicais), armazenadas em formalina 10% tamponada. Os autores avaliaram os níveis de detecção da técnica através da extração destas amostras pelo QIAamp DNA stool minikit da QIAgen®, com 1, 7, 30 e 90 dias de armazenamento, obtendo sucesso em todo o período testado.

No entanto, o uso do formol como conservante é ainda controverso, sendo considerado pela maioria dos autores como inibidor importante da PCR em amostras de fezes (GONIN & TRUDEL, 2003; RAMOS *et al.*, 1999; TROLL *et al.*, 1997; VERWEIJ *et al.*, 2000). Homna *et al.* (1993) relatam que o efeito do conservante na sensibilidade da PCR depende do tempo em que a amostra permanece fixada, da temperatura em que as amostras conservadas são armazenadas e do tamanho do fragmento utilizado como alvo.

1.7 – Inibidores da técnica de PCR em amostras fecais

A execução da técnica de PCR em amostras fecais apresenta em diversos casos, problemas como fatores inibitórios. Estes podem consistir do próprio conservante usado na preservação dos parasitos (GONIN & TRUDEL, 2003; RAMOS *et al.*, 1999; TROLL *et al.*, 1997; VERWEIJ *et al.*, 2000), ácidos biliares que inibem a ação da *Taq* DNA polimerase (WALDERICH *et al.*, 1997), e polissacarídeos que são abundantes em *Entamoeba* (NUÑEZ *et al.*, 2001). Outros componentes como grupo heme e seus produtos metabólicos e polissacarídeos ácidos podem interferir no processo de amplificação. Adicionalmente, existem numerosos organismos nas fezes além das amebas, como bactérias, leveduras e diferentes tipos de produtos de degradação alimentar (MONTEIRO *et al.*, 1997). A fim de reduzir estes fatores que podem interferir na amplificação pela PCR, o uso de kits de extração de DNA com colunas contendo resinas carregadas positivamente são úteis (MONTEIRO *et al.*, 1997; VERWEIJ *et al.*, 2000;). Exemplificando, o QIAamp[®] Stool minikit (Qiagen) é um kit padronizado que contém cápsulas formadas por substâncias que por mecanismo de adsorção, reduzem os inibidores existentes neste tipo de amostra. Entretanto este e outros kits são caros, inviabilizando a utilização de outros protocolos de extração de DNA mais simples e de custo reduzido.

2 – Justificativa

A identificação segura de infecções por *Entamoeba histolytica* constitui assunto prioritário em amebíase desde que a *E. dispar* foi reconhecida como espécie em 1997 pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A *E. histolytica* é a única ameba no intestino humano que invade os tecidos, produzindo no indivíduo infectado graus de morbidade variados, que se não prontamente diagnosticado e tratado pode ser fatal. A *E. dispar* é considerada uma espécie comensal e o tratamento com imidazólicos é dispensável.

A prevalência da *E. histolytica* no mundo hoje é incerta, já que sua distinção da *E. dispar* se dá por técnicas ainda em fase de padronização para uso em larga escala. Dentre estas, a PCR parece ser a mais promissora. Neste trabalho avaliamos a aplicabilidade da PCR como método diagnóstico de infecções por *E. histolytica* e *E. dispar* em amostras fecais provenientes de pacientes brasileiros.

3 – Objetivo Geral

Avaliação da técnica de PCR para o diagnóstico diferencial entre *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* em amostras fecais provenientes de pacientes brasileiros.

3.1 – Objetivos Específicos

- Padronização da PCR para fezes utilizando diferentes protocolos, avaliando:
 - conservantes fecais
 - tempo de manutenção no conservante
 - métodos de extração de DNA
 - procedência da *Taq* DNA polimerase
 - estringência da reação

- Determinação da sensibilidade e especificidade da PCR tendo como padrão o exame coprocópico e a pesquisa de coproantígenos pela técnica de ELISA.

4 – Materiais e Métodos

4.1 – Amostras

Para padronização da PCR foram utilizadas culturas de *E. histolytica* e *E. dispar* previamente caracterizadas quanto à espécie por padrão de Zimodemas (BARRAL DE MARTINEZ *et al.*, 1996) e por PCR (GOMES *et al.*, 1999). Estas cepas foram disponibilizadas sempre para utilização em controles positivos quando da extração de novas amostras de fezes para diagnóstico diferencial. A denominação das cepas, condições de cultura e dados referentes a sua caracterização estão apresentados na Tabela 1.

As amostras fecais utilizadas no estudo, foram provenientes de laboratórios de Análises Clínicas da região da grande Belo Horizonte, Manaus-AM (Fundação de hematologia e hemoterapia do Amazonas-AM), Belém-PA (Instituto Evandro Chagas) e Córrego dos Prazeres-MG. As amostras foram provenientes de indivíduos com exame coproscópico positivo não somente para *E. histolytica/E.dispar*, como também para outros protozoários e helmintos. Amostras negativas para qualquer parasito também foram usadas.

Oito amostras de DNA extraídas pelo kit Genomic Prep[®] de aspirados hepáticos foram utilizadas, sendo estas provenientes de pacientes do Instituto Evandro Chagas (Belém-PA). Estes pacientes apresentavam lesão no fígado diagnosticada por ultrassonografia permitindo o diagnóstico sugestivo de abscesso hepático. Os pacientes apresentavam

os seguintes sintomas e sinais clínicos: dor no hipocôndrio direito, febre, hepatomegalia e icterícia. Após a administração de drogas amebicidas tissulares houve significativa melhora dos sintomas e sinais clínicos da doença.

As amostras fecais foram submetidas à técnica de sedimentação espontânea (LUTZ, 1919) e centrífugo-sedimentação pelo formol-éter, padronizada por Ritchie (1948) e modificada por Blagg *et al.* (1955). Posteriormente, uma parte do sedimento de cada amostra foi corada com lugol a 2% e visualizada no aumento de 40X à microscopia ótica. Outra parte do sedimento, cerca de 200µl, foi transferida para um tubo de microcentrifuga estéril e submetido à centrifugação por 3 minutos, a 10.000 rpm com 1 ml de PBS pH 7.2. Este procedimento foi repetido por três vezes e o sedimento utilizado imediatamente ou armazenado a -20° C para posterior extração de DNA.

Tabela 1: Cepas de *Entamoeba histolytica* e *E. dispar* utilizadas neste estudo com seus respectivos meios cultivo, caracterização clínica e molecular

Cepa	Forma clínica*	Cultivo	Zimodema**	PCR***
HM1	Sintomática (CD)	axênico	II	<i>E. histolytica</i>
HK-9	Sintomática (CD)	axênico	II	<i>E. histolytica</i>
EGG	Sintomática (CD e AHA)	polixênico	XIX	<i>E. histolytica</i>
VEJ	Sintomática (CND)	polixênico	I	<i>E. dispar</i>
JCAO	Sintomática (CND)	polixênico	I	<i>E. dispar</i>
ICB-32	Assintomática	axênico	II	<i>E. histolytica</i>
ICB-452	Assintomática	axênico	II	<i>E. histolytica</i>
WILL	Assintomático	polixênico	I	<i>E. dispar</i>
ADO	Sintomática (CND)	polixênico	I	<i>E. dispar</i>
JPPC	Assintomático	polixênico	I	<i>E. dispar</i>

* CD= Colite disentérica; AHA= Abscesso hepático amebiano; CND= Colite não disentérica

Barral de Martinez *et al.* (1996);*Gomes *et. al.* (1999)

4.1.1 – Controle Positivo e Negativo

Foram utilizadas amostras fecais negativas à microscopia ótica acrescidas de culturas de *E. histolytica* ou *E. dispar* como controle positivo em todas as extrações.

Os controles negativos consistiram de 200 µl de água MiliQ. Esta opção foi feita para garantir que amplificações negativas não seriam resultado da inibição por algum componente fecal.

4.2 – Reação em Cadeia da Polimerase

4.2.1- Escolha do alvo a ser amplificado

Blessmann *et al.* (2002) sugerem uma PCR em tempo real para identificar *E. histolytica* e *E. dispar*. A PCR tem como alvo um segmento gênico do SSU rRNA que possui pequenas modificações nas duas espécies. Estas modificações, apesar de não culminarem em diferenças de tamanho, geraram diferenças que possibilitaram o desenho de iniciadores distintos para a região sense do gene em *E. histolytica* e *E. dispar*. Os iniciadores são: sense Eh: GTACAAAATGGCCAATTCATTC e sense Ed: GTACAAAGTGGCCAATTTATG O iniciador anti-sense é o mesmo nas duas espécies: Eh/Ed: GAATTGATTTTACTCAACTCTAG.

Este alvo foi escolhido por estar presente em aproximadamente 200 cópias por trofozoítio (BHATTACHARYA *et al.*,1998) representando um aumento da sensibilidade no diagnóstico, já que a PCR em tempo real foi adaptada para a convencional.

Inicialmente utilizou-se amostras de cultura previamente identificadas como *E. histolytica* e *E. dispar*.

O mix da PCR foi preparado para o volume final de 10 μ l com os seguintes reagentes: H₂O miliQ, q.s.p. para 10 μ l, Tampão de PCR 10X, MgCl₂ (1,5mM), *Taq* DNA Polymerase (0,2U), dNTPs (0,2mM), 5 pmol de cada iniciador e 50ng de DNA de cultura ou 1 μ l de DNA extraído de fezes. As amostras foram colocadas na máquina de PCR, submetidas a 50 ciclos de desnaturação a 95^o C por 45 segundos, anelamento a 58^o C por 30 segundos e extensão a 72^o C durante 45 segundos.

4.2.2- Visualização dos produtos da PCR

Os produtos de amplificação obtidos na PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 4%. O gel foi constituído de 4 ml de solução de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (v/v); 600 μ l de tampão TAE 50x (Tris base, ácido acético, EDTA 0,5M pH 8,0 – anexo E), 250 μ l de persulfato de amônio a 10%; 20 μ l de TEMED e água destilada para volume final de 30 mL. As amostras foram aplicadas em tampão de amostra 1x (TAE 1X, 0,25% de azul de bromofenol, 1,5% de glicerol e 0,25% de xilenocianol). O gel foi submetido à tensão de 100 V em tampão TAE 1x por aproximadamente 2 horas. Após a corrida, os géis foram aplicados em uma solução fixadora contendo etanol a 10% e ácido acético a 0,5% por 3 minutos, sob suave agitação. Em seguida, o gel foi corado em solução de nitrato de prata a 0,2% por 7 minutos e lavado com água destilada por duas vezes. O gel foi colocado em solução

reveladora (NaOH 3% e 0,3% de formaldeído P.A.) até as bandas contendo os fragmentos de interesse aparecessem. Após descarte da solução reveladora o gel foi transferido novamente para solução fixadora para interromper a reação (SANTOS *et al.*, 1993).

4.3 – Padronização e otimização da PCR

4.3.1 – Conservantes fecais e tempo de acondicionamento das amostras

O formol é considerado por vários autores como inibidor da PCR em amostras fecais (GONIN & TRUDEL, 2003; RAMOS *et al.*, 1999; TROLL *et al.*, 1997; VERWEIJ *et al.*, 2000;). No entanto Paglia & Visca, (2004) e Sanuki *et al.* (1997) observaram ampliações positivas em amostras conservadas em formalina. Considerando a importância do uso deste conservante, não só para estudos epidemiológicos, como também para estudos diversos em amostras fecais, foi observado seu efeito na PCR utilizando amostras armazenadas em formalina contendo cistos e trofozoítos. Alternativamente, para efeito comparativo foram utilizadas amostras acondicionadas em etanol 92% e PBS pH 7,2.

Cerca de 200 trofozoítos de cultura de *E. histolytica* foram homogeneizados em 200 µl de formalina 10% tamponada (anexo D), etanol 92% e PBS pH 7,2. A partir do primeiro dia de obtenção das amostras procedeu-se a extração do DNA semanalmente durante 2 meses. Foram utilizadas também amostras fecais positivas para *E. histolytica*/*E.*

dispar confirmadas através da microscopia ótica acondicionadas em formalina 10% e PBS pH 7,2 por períodos tão longos quanto 24 meses.

4.3.2- Extração de DNA

Foram avaliados 4 diferentes protocolos de extração de DNA. O material para extração consistiu de fezes positivas a microscopia ótica para cistos e/ou trofozoítos de *E. histolytica*/*E. dispar*. Como controle positivo utilizou-se amostras fecais negativas acrescidas de trofozoítos provenientes de culturas de *E. histolytica* e *E. dispar*. Durante o desenvolvimento do projeto, percebeu-se que amostras fecais contendo somente cistos não rendiam ampliações positivas. Desta forma, passou-se a verificar se as metodologias descritas consideravam o rompimento dos cistos e se nas condições descritas os mesmos eram rompidos. A maioria dos métodos descritos desconsideravam o problema. Alguns procedimentos que descreviam etapas que contemplavam este aspecto não produziram o resultado esperado. Assim foi acrescentada às metodologias descritas a etapa de rompimento dos cistos, que inicialmente foi executada através de sonicação e posteriormente por congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido a -196°C .

4.3.2.1 – Método de Sanuki *et al.* (1997)

As amostras selecionadas, controles positivos e negativos foram submetidos ao congelamento em nitrogênio líquido a -196°C e posterior descongelamento em banho-maria a 37°C . Cerca de 200 μl de Triton X-100 foi adicionado a cada amostra e esta foi

incubada a 90°C por duas horas. Um agente solubilizante (proteínase K a 5mg/ml, Tris-HCl a 10 mM, EDTA a 10 mM e SDS a 0,5%) foi adicionado às amostras e estas foram incubadas a 60°C por duas horas. O DNA foi extraído através do método de fenol-clorofórmio (AUSUBEL *et al.*, 1994) e precipitado através de etanol 95% e estocado a –20°C.

4.3.2.2 – Método de Aguirre *et al.* (1995)

O sedimento da amostra fecal foi congelado em nitrogênio líquido a –196°C e descongelado em imersão em água à temperatura ambiente por três vezes. A amostra foi centrifugada a 5.600 rpm por um minuto e o sobrenadante foi diluído na proporção de 1:1 em um tampão de lise (NaCl a 50 mM, EDTA a 50 mM, SDS a 1% e Tris-HCl a 50 mM, pH 8,0) contendo 100 µl/ml de proteínase K. A incubação foi feita de um dia para o outro a 37°C, seguida de extração em fenol-clorofórmio (AUSUBEL *et al.*, 1994) e precipitação com etanol a 95%.

4.3.2.3 – QIAamp DNA stool minikit (QIAGEN®)

Foi adicionado 0,5 ml de tampão ASL a aproximadamente 200mg de fezes, a mistura foi homogeneizada ao vórtex por 15 segundos e incubada a 70°C por 5 minutos. A mistura foi centrifugada a 14.500 rpm e 1,2 ml do sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrifuga estéril. Um tablete de Inhibitex® foi adicionado e o tubo foi homogeneizado ao vórtex por um minuto. A amostra foi incubada à temperatura

ambiente por um minuto e centrifugada a 14.500 rpm por um minuto. O sobrenadante foi pipetado e transferido para um novo tubo de microcentrífuga estéril e este foi centrifugado a 14.500 rpm por 3 minutos. A um novo tubo de microcentrífuga estéril foi adicionado 15µl de Proteinase K, 200µl do sobrenadante e mais 200µl do tampão AL. Esta mistura foi homogeneizada ao vórtex por quinze segundos. A amostra foi incubada a 70°C por 10 minutos. Cerca de 200 µl de etanol 95% foi adicionado ao lisado e este foi homogeneizado ao vórtex por 15 segundos. O lisado foi adicionado na coluna contendo uma resina e este foi centrifugado a 14.500 por um minuto. O filtrado foi descartado e a coluna contendo a resina foi transferida para o encaixe com outro tubo de microcentrífuga. Cerca de 500µl de tampão AW1 foi adicionado à coluna e centrifugado a 14.500 rpm por um minuto. Cerca de 500 µl do tampão AW2 foi adicionado na coluna e centrifugado a 14.500 rpm por 3 minutos. Esta última etapa foi repetida e 200 µl do tampão AE foi adicionado à coluna e incubado por um minuto à temperatura ambiente. O tubo foi centrifugado a 14.500 rpm por 1 minuto, a coluna retirada do mesmo, e o DNA eluído foi armazenado a 4°C ou usado imediatamente.

4.3.2.4 – Lise Alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Foram adicionados 200 µl de tampão de lise (Glicose a 50 mM, Tris-HCl a 25 mM, 10 mM de EDTA) a aproximadamente 200 mg de sedimento fecal. Esta mistura foi incubada por cinco minutos à temperatura ambiente. A seguir foi adicionado à mistura uma solução de NaOH 0.2 M com SDS 1%, sendo esta sonicada (aparelho Ultrasonic Homogenizer-4710 series, 20 KHZ, 50 watts, Cole Pamer instruments co. USA) 2 vezes com ciclos de 35 de amplitude por 30 segundos. O sonicado foi incubado em gelo por

cinco minutos e em seguida foi adicionado 300µl de acetato de amônio 7.5 mM. A amostra foi incubada no gelo por vinte minutos e foi centrifugada a 13.500 rpm por cinco minutos. Após a incubação o DNA foi separado do sedimento por centrifugação e precipitado com 0,6 volumes de isopropanol, sendo o DNA então incubado novamente por 60 minutos a -20 °C. Este DNA precipitado foi concentrado por centrifugação a 14.500 rpm por quinze minutos e lavado com etanol a 70%. O DNA purificado foi resuspenso em 20µl de tampão TE 1X (Tris-HCl a 10mM e EDTA a 1mM) ou em 20µl de água mili-Q autoclavada e incubada a 37° C por quinze minutos.

4.3.3- Sensibilidade da PCR

Amostras de fezes negativas para qualquer parasito foram acrescidas, de cultura axênica de *E. histolytica*, em quantidades que variaram de 1 a 200 trofozoítos. Após associação dos trofozoítos às fezes o material foi submetido à extração de DNA por Lise Alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989), e em seguida o DNA purificado foi utilizado na PCR.

4.3.4 – Especificidade da PCR

Amostras fecais contendo outros protozoários que não *E. histolytica*/*E. dispar* e também helmintos foram usados para se verificar a possibilidade de ampliações inespecíficas. Foram também utilizadas amostras fecais negativas para qualquer parasito.

4.3.5 - Procedência da *Taq* DNA polimerase e estringência da reação.

Foram usados protocolos com três diferentes marcas de *Taq* DNA polimerase e também BSA numa tentativa de melhorar o rendimento da PCR. Foram usadas as enzimas das marcas Promega[®], Invitrogen[®] e Pharmacia[®]. Os protocolos das reações foram como descritos no item 4.1 (PCR) modificando apenas a quantidade de água no final da reação em concordância com a quantidade do íon Magnésio presente no tampão da reação. O DNA para a PCR foi obtido por extração pela Lise Alcalina de quatro amostras fecais positivas para cistos de *E. histolytica*/*E. dispar*. 1 µl de cada amostra foi usado na PCR específica.

A estringência da reação foi avaliada por modificação na temperatura de anelamento dos iniciadores ao DNA alvo. A temperatura escolhida de início foi de 57°C calculada para a reação, considerando a seqüência dos iniciadores. Devido à presença de bandas espúrias, outros protocolos com temperaturas crescentes de 58° C até 65° C foram avaliadas.

4.4 – Correlação entre PCR, Zimodema, Coproantígenos e Microscopia ótica.

Para a comparação com o zimodema foram utilizadas amostras fecais negativas acrescidas de cepas de *E. histolytica* e *E. dispar* mantidas em cultivo com zimodema

previamente descrito (BARRAL DE MARTINEZ *et al.*, 1996). As 10 cepas usadas estão apresentadas na tabela 1.

Para comparação com a técnica de ELISA (*Entamoeba histolytica* test II – Techlab) e microscopia ótica, foram utilizadas 90 amostras fecais procedentes de diversos locais. Dentre estas amostras, 41 foram submetidas à técnica de coproantígenos e a microscopia ótica. Trinta, foram provenientes da Fundação de hematologia e hemoterapia, de dois hospitais e do Centro de Referência do Amazonas em Manaus-AM, 7 provenientes do Instituto Evandro Chagas Belém-PA e 4 do município de Córrego dos Prazeres-MG. As amostras do Amazonas foram transportadas até Belo Horizonte para serem avaliadas pela técnica de coproantígenos no Laboratório de Amebíase-Departamento de Parasitologia, ICB-UFMG. A técnica de coproantígenos foi executada nas outras amostras em seus respectivos locais de origem. Estas amostras foram gentilmente cedidas pelas professoras Flora Benneton da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Mônica Morais Coimbra da Universidade Federal do Pará (UFPA) e Cíntia Furst Leroy Gomes da Universidade do Vale do Aço (UNIVALE).

As 49 amostras restantes foram examinadas somente através da microscopia ótica. Vinte e quatro delas foram provenientes do Instituto Evandro Chagas Belém-PA, uma do município de Córrego dos Prazeres-MG e o restante da Grande Belo Horizonte, derivadas de Laboratórios como Hermes Pardini, do Hospital da Previdência de Minas Gerais e de indivíduos voluntários.

4.5 - Inibição da PCR por substâncias presentes nas fezes

Algumas amostras positivas à microscopia ótica foram negativas na PCR. A presença de inibidores nestas amostras seria uma das prováveis causas deste resultado. Para avaliar esta possibilidade, utilizamos como alvo na PCR um fragmento de aproximadamente 250 pb do gene humano HLA-DRB (SPURKLAND *et. al*, 1993). Cinco amostras positivas na microscopia ótica e negativas na PCR foram escolhidas aleatoriamente.

5 – Resultados

5.1 - Alvo para a PCR

A PCR de um fragmento do ssu rRNA em tempo real descrita por Blessmann *et al.* (2002) foi adaptada para a PCR convencional. Foi amplificado um fragmento de aproximadamente 310 pb em culturas previamente identificadas como *E. histolytica* e *E. dispar* (Figura 4).

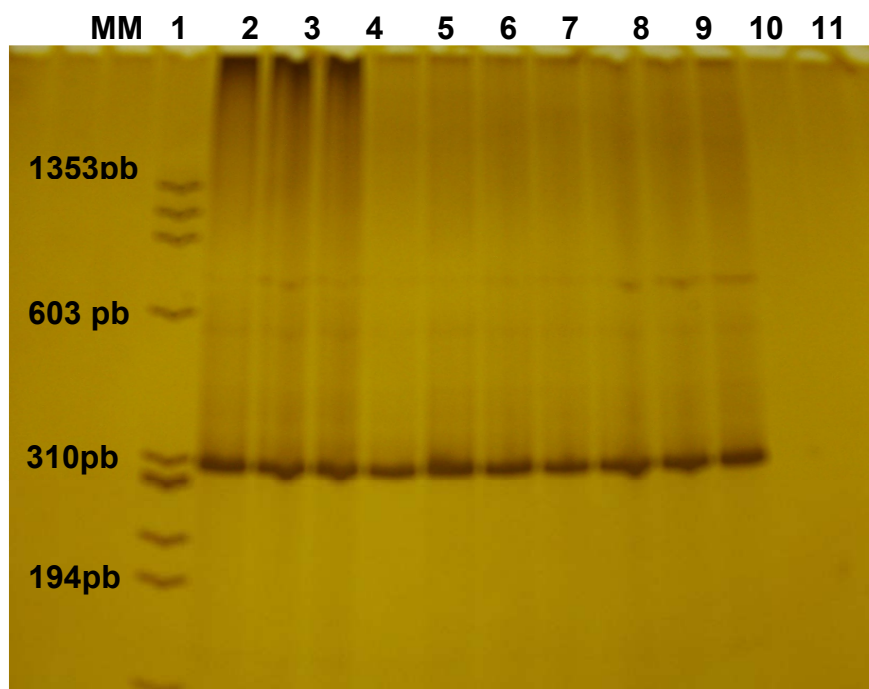


Fig. 4: Gel de poliacrilamida 4% corado pela prata, mostrando os fragmentos de 310 pb resultantes da amplificação do gene da SSU rDNA. MM = ϕ X174 digerido com *HaeIII*. Canaletas de 1-5 = cepas de *E. histolytica*: HM1, HK-9, EGG, ICB-32 e ICB-452. Canaletas de 6-10 = cepas de *E. dispar*: VEJ, JCAO, WILL, ADO e JPPC. Canaleta 11 = controle negativo da PCR sem DNA.

5.2 – Padronização e Otimização da PCR

5.2.1 – Conservantes fecais e tempo de acondicionamento das amostras

A figura 5 mostra o resultado da PCR obtida de cultura axênica da cepa HM1 de *E. histolytica*, adicionada de formol 10% tamponado, etanol 92% e PBS pH 7,2, armazenadas a -20°C . Ocorreu amplificação em todas as amostras possibilitando a identificação da espécie de ameba em qualquer dos conservantes utilizados. Ocorreu amplificação positiva para *E. dispar* em amostras fecais conservadas por até 2 anos em formol e PBS (dados não mostrados) a 4°C .

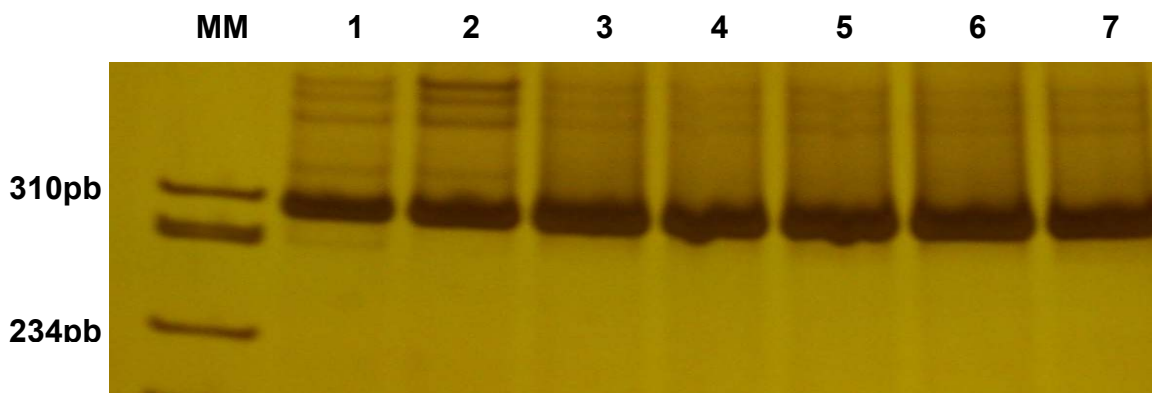


Fig. 5: Efeito de conservantes na amplificação do fragmento de 310 pb do gene SSU rRNA em cepas de *E. histolytica*. Canaletas 1,2 e 3: pellet de cultura de *E. histolytica* adicionado a 200 μl de formalina 10%, 200 μl de etanol 92% e 200 μl de PBS 7,2, armazenados a -20°C por 15 dias. Canaletas 4, 5 e 6: pellet de cultura de *E. histolytica* adicionado a 200 μl de formalina 10%, 200 μl de etanol 92% e 200 μl de PBS 7,2, armazenados a -20°C por 30 dias. Canaleta 7: pellet de cultura de *E. histolytica* adicionado a 200 μl de formalina 10%, armazenados a -20°C por 60 dias. MM = ϕX174 digerido com *HaeIII*

5.2.2 – Métodos de extração do DNA de *Entamoeba* de fezes

Foram utilizados 4 métodos de extração de DNA de fezes. Avaliamos a exeqüibilidade, custo e sensibilidade.

Em um experimento foram utilizadas amostras fecais positivas a microscopia ótica para *E. histolytica/ E. dispar*. Algumas destas amostras foram identificadas como *E. histolytica* pelo Kit Techlab® II. Controles positivos (fezes negativas acrescidas de cultura de *E. histolytica* ou *E. dispar*) e negativos (somente água destilada) foram incluídos em todas reações.

Nenhuma amostra, com exceção do controle positivo rendeu amplicons na PCR quando o DNA foi extraído pelos métodos propostos por Aguirre *et al.* (1996) e Sanuki *et al.* (1997), baseados em congelamento e descongelamento, lise e digestão com proteinase K e extração por fenol/clorofórmio.

Os dois outros métodos avaliados foram o de Lise alcalina (AUSUBEL *et al.*, 1994; SAMBROOK *et al.*, 1989) e o método de extração utilizando o kit QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN®). Amostras positivas para cistos do complexo *E.histolytica/E.dispar* foram utilizadas na extração e também controles positivo e negativo como citado anteriormente. Todas amostras foram positivas na PCR quando a etapa de rompimento

dos cistos foi acrescentada. Resultados negativos foram obtidos para estas mesmas amostras quando a etapa de rompimento dos cistos não foi empregada (Figura 6)

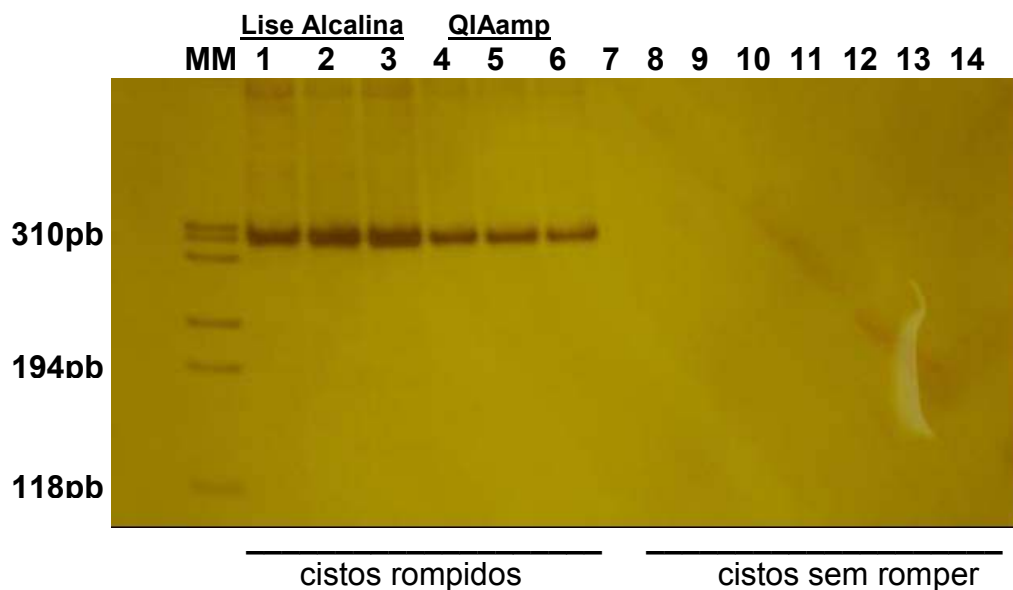


Figura 6: Eletroforese em gel de poliacrilamida 4% mostrando produtos de amplificação do fragmento de 310 pb do gene SSU rRNA para *E. dispar* em três amostras fecais. As canaletas de 1 a 3 mostram os produtos obtido do DNA extraído pelo método de Lise Alcalina. As canaletas de 4 a 6 mostram o mesmo material com DNA extraído pelo kit QIAamp. Nas canaletas de 1 a 6 os cistos foram rompidos e de 7 a 12 não. Canaletas 13 e 14 = Controles negativos das extrações de lise Alcalina e pelo kit com etapa de rompimento dos cistos, respectivamente. MM = ϕ X174 digerido com *HaeIII*

5.2.3 – Sensibilidade da PCR

Foram associados 1, 50, 100, 150 e 200 trofozoítos oriundos de cultura axênica à fezes negativas para qualquer parasito, armazenadas em formalina a 10%. A PCR do material extraído destas amostras se mostrou sensível para identificar até um trofozoíto (Figura 7).

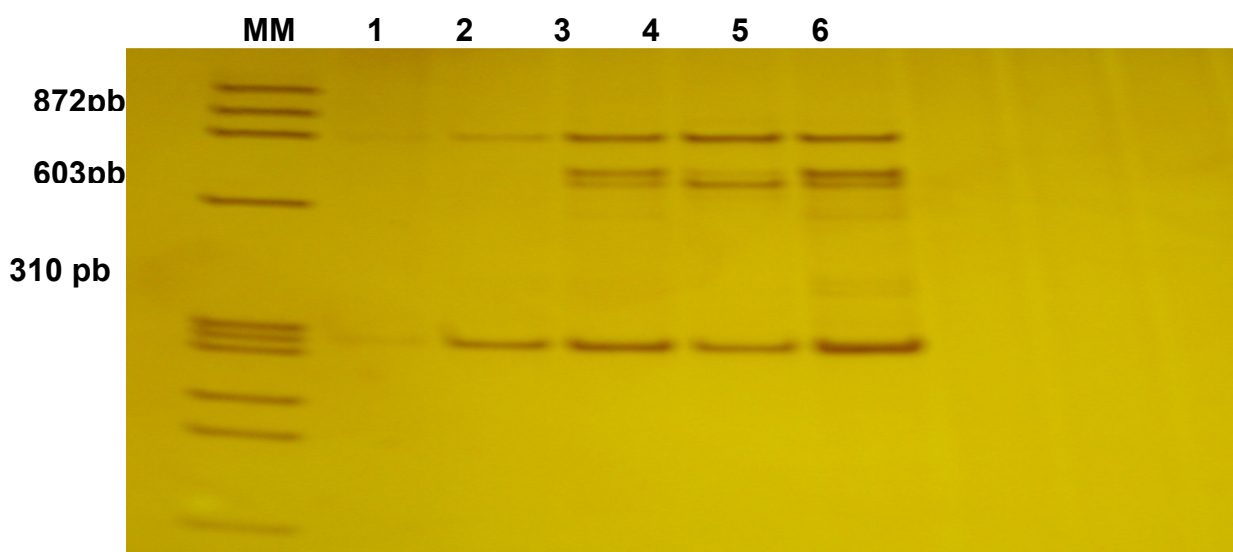


Fig. 7: Eletroforese em gel de poliacrilamida 4% mostrando os produtos amplificados na PCR para o gene SSU rRNA em quantidades crescentes de trofozoítos de *E. histolytica*. Canaletas 1 – 5 representam respectivamente 1, 50, 100, 150 e 200 trofozoítos da cepa HM1 em cultura axênica. Canaleta 6: controle negativo da PCR sem DNA. MM = ϕ X174 digerido com *HaeIII*

5.2.4 – Especificidade da PCR

Para avaliar a especificidade da PCR foram usadas amostras fecais positivas para *Blastocystis hominis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*. Adicionalmente foram testadas amostras fecais

negativas para qualquer protozoário parasito ou comensal. Nenhuma amplificação ocorreu na PCR utilizando DNA extraído destas amostras.

5.2.5 – Procedência da *Taq* DNA polimerase e estringência da reação

O desempenho da *Taq* DNA polimerase no rendimento da PCR para diferenciação entre *E. histolytica* e *E. dispar* foi avaliado para 3 diferentes marcas comerciais das enzimas, Promega[®], Invitrogen[®] e Pharmacia[®]. A figura 8 mostra o resultado da PCR usando estas enzimas. As amostras utilizadas foram identificadas como positivas ao microscópio ótico para *E. histolytica/E.dispar*. Na PCR estas amostras foram identificadas como *E. dispar*. As três enzimas produziram resultados satisfatórios sendo que a marca Invitrogen produziu os melhores resultados.

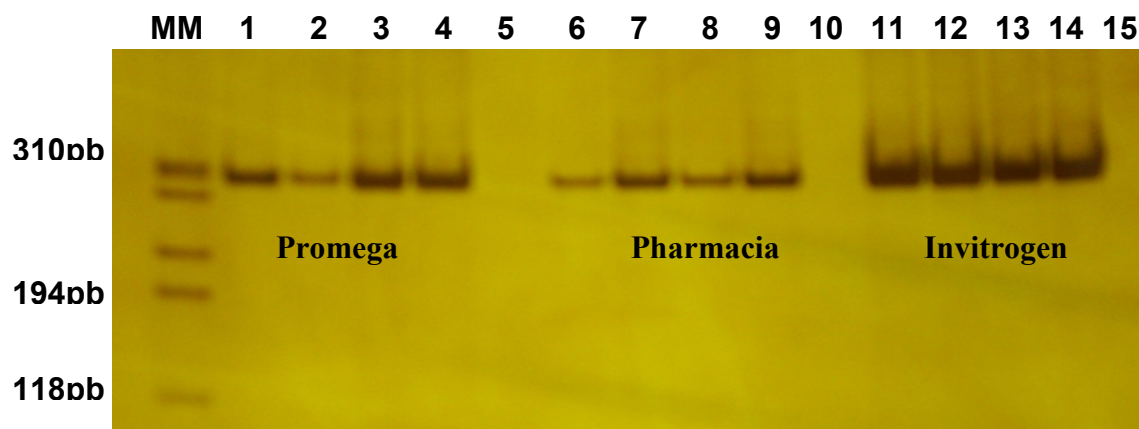


Fig. 8: Eletroforese em gel de poliacrilamida 4% mostrando o desempenho de 3 diferentes marcas comerciais de *Taq* DNA Polimerase na PCR para identificar *E. dispar* em amostras fecais. Canaletas 5, 10 e 15 = controle negativo da reação sem DNA. MM = ϕ X174 digerido com *HaeIII*

A estringência da reação foi avaliada modificando-se a temperatura de anelamento dos iniciadores ao DNA alvo. Variações de temperatura entre 57 e 65°C não renderam alterações significantes no perfil de bandas revelado na eletroforese.

5.3 - Correlação entre PCR, Zimodema, ELISA e Microscopia ótica.

Dez diferentes amostras de cultura foram identificadas pelo zimodema e PCR. Cinco destas amostras foram identificadas como *E. histolytica* e 5 como *E. dispar*. Foi observada perfeita concordância entre a PCR e o zimodema (Tabela 2).

Tabela 2. Cepas de *Entamoeba histolytica* e *E. dispar* identificadas pelo padrão de Zimodemas e pela PCR.

Cepa	Cultivo	Zimodema*	PCR rRNA
HM1	axênico	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>
HK-9	axênico	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>
EGG	polixênico	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>
VEJ	polixênico	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>
JCAO	polixênico	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>
ICB-32	axênico	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>
ICB-452	axênico	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>
WILL	polixênico	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>
ADO	polixênico	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>
JPPC	polixênico	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>

*Barral de Martinez *et al.* (1996).

Quarenta e uma amostras examinadas pela técnica de coproantígenos foram usadas para comparação com a PCR. Quatorze amostras foram positivas para *E. histolytica* e 27 negativas. Das 14 amostras positivas pela técnica de coproantígenos, 10 foram positivas na PCR, sendo 9 para *E. histolytica* e 2 para *E. dispar*. Entre as 27 amostras negativas, nenhuma amostra foi positiva na PCR para *E. histolytica* e três foram positivas para *E. dispar*. Estes resultados estão sumarizados na tabela 3.

Tabela 3: Resultados comparativos dos exames a microscopia ótica, da pesquisa de antígenos (ELISA) e da PCR em amostras fecais.

	ELISA		PCR	
	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>
+	14	8	1	1
-	27	0	3	0
TOTAL	41	9	5	1

Noventa amostras examinadas ao microscópio tiveram seus resultados comparados a PCR. Destas, 53 foram positivas para cistos do complexo *E. histolytica/E. dispar* (uma das amostras foi positiva também para trofozoítos) à microscopia ótica e 37 foram negativas. Destas 53 amostras positivas à microscopia ótica, 16 mostraram-se positivas na PCR para *E. histolytica* e 23 para *E. dispar*. Entre estas amostras a PCR detectou duas infecções mistas. Das 37 amostras negativas, 3 mostraram-se positivas na PCR para *E. histolytica* e 3 para *E. dispar* (tabela 4).

Tabela 4: Resultados comparativos da Microscopia ótica, e da PCR para o gen do rRNA para 90 amostras fecais procedentes de Manaus-AM, Belém-PA, e da Grande Belo Horizonte

	Microscopia ótica		PCR	
	<i>E.histolytica/ E.dispar</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>E.dispar</i>	<i>E. histolytica / E.dispar</i>
+	53	15	22	2
-	37	3	3	0
Total	90	18	25	2

A análise de concordância entre as técnicas foi feita através do programa Win Episcopo 2.0 (THRUSFIELD *et al.*, 2001). Estas análises foram feitas com um nível de confiança de 95% para o índice Kappa, e para os valores de sensibilidade, especificidade da técnica de PCR em relação à técnica de coproantígenos e à microscopia ótica.

A tabela 5 mostra a concordância entre a técnica de PCR e o exame à microscopia ótica. Foi observada uma concordância de 76% entre as duas técnicas. O índice Kappa foi de 0.515. A sensibilidade da PCR em relação à microscopia ótica foi de 70% e a especificidade de 84%.

Tabela 5: Concordância, sensibilidade, especificidade da PCR em relação à microscopia ótica

PCR	Microscopia ótica		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	37	6	43
Negativo	16	31	47
TOTAL	53	37	90

Concordância observada: 0.756

Concordância esperada: 0.496

Coefficiente Kappa: 0.515

Nível de confiança: 95%

Limite inferior Limite superior

0.313 0.716 0.103 se (0)

0.337 0.693 0.091 se (1)

Medida de Associação e de intervalo de confiança de 95%

Sensibilidade: **69.811%** (Limite inferior: 57.452/Limite superior: 82.171)

Especificidade: **83.784%** (Limite inferior: 71.907/Limite superior: 95.661)

A tabela 6 mostra os valores de concordância entre as técnicas de ELISA e PCR para o rRNA. A concordância observada foi de 88% e o respectivo índice Kappa foi 0,703, indicando uma boa concordância entre as duas técnicas. A sensibilidade da técnica de PCR em relação ao ELISA (coproantígenos) apresentou um valor de 64%, e a sua especificidade, 100%.

Tabela 6: Concordância, sensibilidade, especificidade da PCR em relação ao teste de ELISA (*Entamoeba histolytica* II Test- TechLab®)

PCR	ELISA		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	9	0	9
Negativo	5	27	32
TOTAL	14	27	41

Concordância observada: 0.878

Concordância esperada: 0.589

Coefficiente Kappa: 0.703

Nível de confiança: 95%

Limite inferior	Limite superior	
0.411	0.996	0.149 se (0)
0.464	0.942	0.122 se (1)

Medida de Associação e de intervalo de confiança de 95%

Sensibilidade: 64.286%(Limite inferior: 39.186/Limite superior: 89.386)

Especificidade: 100.000%(Limite inferior: 100.000/Limite superior: 100.000)

5.4- Inibição da PCR por substâncias presentes nas fezes

A Figura 9 mostra o resultado da identificação específica de 15 amostras de fezes positivas ao microscópio ótico. Destas amostras, 10 foram identificadas como *E. dispar*, as 5 restantes foram negativas para *E. histolytica* e *E. dispar*. Estas cinco amostras negativas foram submetidas a PCR para o gene HLA-DRB (SPURKLAND *et. al*, 1993). Três foram positivas na PCR (canaletas 3, 4 e 12) e duas foram negativas (canaletas 14 e 15).

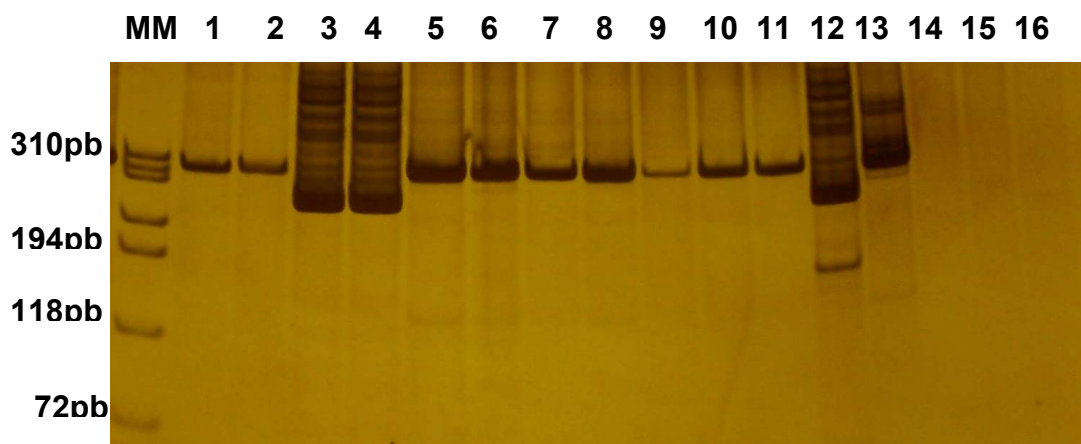


Fig. 9: Eletroforese em gel de poli-acrilamida 4% corado pela prata em amostras fecais submetidas à PCR para amplificar o gen do SSU rDNA (subunidade menor do DNA ribossomal) e o gen HLA-DRB. Canaletas 1, 2, 5-11 e 13: amostras fecais positivas para *E. dispar* na PCR para o rDNA. Canaletas 3, 4 e 12: amostras fecais positivas a microscopia ótica para cistos de *E. histolytica/E. dispar*, negativas na PCR para o rDNA e positivas na PCR para o gene humano HLA-DRB. Canaletas 14 e 15: amostras fecais positivas a microscopia ótica para cistos de *E. histolytica/E. dispar*, negativas na PCR para o rDNA e negativas na PCR para o gene humano HLA-DRB. Canaleta 16: controle negativo da reação sem DNA. MM = ϕ X174 digerido com *HaeIII*

6 – Discussão

A amebíase é a infecção humana causada pelo protozoário *Entamoeba histolytica*. Estimava-se que 12% da população do mundo albergavam o parasita e destes somente 10% apresentavam evidência clínica da infecção (MARTINEZ-PALOMO, 1998). Devido a grande quantidade de indivíduos assintomáticos infectados com *E. histolytica*, foi sugerido em 1925 e posteriormente confirmado pela OMS em 1997 a existência de outra ameba responsável pelas infecções assintomáticas (BRUMPT, 1925; WHO, 1997). Esta outra espécie, indistinguível à microscopia ótica da *E. histolytica*, foi denominada *E. dispar* e a ela tem sido atribuído a maioria dos casos assintomáticos (WHO, 1997). Desde então a real prevalência da infecção humana pela *E. histolytica* é desconhecida. Alguns trabalhos têm discutido a melhor ferramenta para identificação das espécies.

Atenção especial tem sido dada à identificação de lectinas da superfície amebiana e seqüências gênicas espécie-específicas (HAQUE *et al.*, 1995; HAQUE *et al.*, 2000; HUSTON *et al.*, 1999; MIRELMAN *et al.*, 1997; PETRI *et al.*, 2000; TANYUSKEL & PETRI, 2003). A utilização da lectina Gal/GalNac presente na membrana da *E. histolytica* como alvo num ELISA de captura tem sido amplamente utilizado (HAQUE *et al.*, 2000; TANYUSKEL & PETRI, 2003, TANYUKSEL *et al.*, 2005). No entanto seu custo constitui barreira para sua utilização principalmente para estudos epidemiológicos em muitos países. Devemos ainda acrescentar que a sensibilidade do método deixa a desejar quando comparado a PCR (MIRELMAN *et al.* 1997; ROY *et al.*, 2005).

Muitas são as seqüências gênicas candidatas ao diagnóstico diferencial entre *E. histolytica* e *E. dispar* pela técnica de PCR (CLARK & DIAMOND, 1991; FREITAS *et al.*, 2003; ROY *et al.*, 2005; TACHIBANA *et al.*, 1991; TANNICH *et al.*, 1991; ZENGZHU *et al.*, 1999). O método é promissor do ponto de vista da sensibilidade e especificidade, duas qualidades imprescindíveis para testes diagnósticos. No entanto, as metodologias de PCR descritas são ainda muito laboriosas e apresentam custo elevado. O principal entrave neste sentido é a etapa de extração de DNA. Nesta fase encontramos as metodologias mais difíceis de reproduzir como também as mais caras. Geralmente os melhores resultados são obtidos com a utilização de kits, o que torna o diagnóstico molecular inviável para o sistema de saúde, privado ou público, em países como o nosso.

Neste trabalho nossa intenção foi padronizar a PCR para diagnóstico diferencial entre *E. histolytica* e *E. dispar* provenientes de amostras fecais e avaliar sua aplicabilidade como ferramenta diagnóstica para amebíase no Brasil.

Neste contexto o primeiro desafio foi escolher o alvo da PCR entre os muitos já descritos (ALI *et al.*, 2003; AGUIRRE *et al.*, 1995; BRITTEN *et al.*, 1997; BLESSMANN *et al.*, 2003; CLARK & DIAMOND, 1991; EVANGELOPOULOS *et al.*, 2000; GONIN & TRUDEL, 2003; KATZWINKEL-WLADARSCH *et al.*, 1994; NÚÑEZ *et al.*, 2001; PAGLIA & VISCA, 2004; RAMOS *et al.*, 1999; TROLL *et al.*, 1997; VERWEIJ *et al.*, 2001). Optou-se pelos genes da ssu rRNA por sua significativa importância na diferenciação das amebas (CLARK & DIAMOND, 1991; BHATTACHARYA *et al.*, 1998) e também por se apresentar em um elevado número de cópias. O rDNA em *E. histolytica/E. dispar* é

episomal e possui 200 cópias (BHATTACHARYA *et al.*, 1998), o que aumenta a sensibilidade do ensaio.

A escolha da seqüência considerou não só sua consagração como alvo espécie-específico por alguns autores (BLESSMANN *et al.*, 2003; GONIN & TRUDEL, 2003) como também por seu tamanho. A seqüência escolhida consistiu de um fragmento de 310 pb para as duas espécies. A utilização desta seqüência possibilitou que o trabalho fosse desenvolvido com passos curtos de anelamento e alongamento na PCR, deixando o método diagnóstico mais rápido. Soma-se a isto a melhor resolução deste segmento gênico em eletroforese em gel de poliacrilamida.

Para revelação dos amplicons pós PCR, usamos a eletroforese em gel de poliacrilamida corado pela prata. Julgamos que este sistema renderia melhores resultados que a revelação em agarose, por apresentar uma malha mais densa e as bandas apresentarem maior resolução. Como podemos notar nos resultados (Figura 7), este sistema foi capaz de revelar a presença de um único trofozoíto. A sensibilidade da poliacrilamida sobre a agarose foi confirmada quando comparamos a sensibilidade da PCR para o rDNA com a apresentada por outros autores (ACUNA SOTO *et al.*, 1993; EVANGELOPOULOS *et al.*, 2000; KATZWINKEL-WLADARSCH *et al.*, 1994; NÚÑEZ *et al.*, 2001; SANTOS, 2005).

Estando o alvo escolhido partiu-se para a extração de DNA de amostras fecais. Inicialmente verificou-se a possibilidade de utilização de fezes mantidas em conservantes, assunto controverso na literatura.

O uso de conservantes fecais facilita o diagnóstico morfológico não só quando a microscopia é adiada, como também quando é imediata. Geralmente o material a fresco usado para diagnóstico apresenta material já alterado morfológicamente, dificultando o diagnóstico. O uso do conservante, geralmente formalina a 10%, mesmo quando não utilizada corretamente, melhora a qualidade do exame. Para estudos epidemiológicos toma importância maior, já que o acondicionamento das fezes na geladeira nem sempre é possível. No caso da PCR o uso de conservantes se justifica pelos mesmos motivos citados para microscopia ótica, mas também pela importância da degradação do DNA por nucleases nas amostras que não forem acondicionadas a -20° C. O formol é considerado por alguns autores, inibidor da PCR em amostras fecais (GONIN & TRUDEL, 2003; RAMOS *et al.*, 1999; TROLL *et al.*, 1997; VERWEIJ *et al.*, 2000) e inofensivo para outros (PAGLIA & VISCA, 2004; SANUKI *et al.*, 1997;).

Para avaliar o efeito da formalina na PCR de amostras fecais, associou-se trofozoítos em cultura à solução de formalina tamponada 10%. Comparamos os resultados da PCR em amostras mantidas na formalina ao de amostras mantidas em etanol, considerado alternativa como conservante fecal (LEBBAD & SVARD, 2005). Como controle positivo utilizamos as mesmas amostras mantidas em PBS.

O efeito dos conservantes foi avaliado durante um mês, por julgar este período suficiente para trabalhos epidemiológicos. As amostras acondicionadas em etanol e formalina apresentaram rendimento semelhante na PCR, aos obtidos com as amostras em PBS. Estes resultados se somam aos de Paglia & Visca (2004) e sugerem que outros agentes presentes nas fezes podem ser responsáveis pela interferência na PCR.

Baixo rendimento na extração do DNA das fezes, interferência de DNA de outros organismos no encontro dos iniciadores com a seqüência alvo também poderiam contribuir para os resultados negativos.

A partir destes resultados prévios, foram utilizadas amostras acondicionadas em formalina, PBS e a fresco para extração de DNA para a PCR. Cabe aqui salientar que algumas amostras acondicionadas em formol e PBS por até 2 anos produziram resultados positivos (dados não mostrados).

Muitas são as metodologias descritas para extração de DNA de *E. histolytica*/*E. dispar* de fezes (ACUNA SOTO *et al.*, 1993, EVANGELOPOULOS *et al.*, 2000; KATZWINKEL-WLADARSCH *et al.*, 1994; NÚÑEZ *et al.*, 2001; RIVERA *et al.*, 1996; TROLL *et al.*, 1997). Dentre estes, escolhemos inicialmente os métodos de Aguirre *et al.* (1996) e Sanuki *et al.* (1997), por sua exeqüibilidade, custo e por representarem a maioria dos métodos de extração já descritos. Estes métodos apresentam princípios semelhantes com duas importantes diferenças: quantidade de cistos para o diagnóstico e tempo de digestão com proteinase K. A quantidade de cistos nas fezes de indivíduos infectados com *E. histolytica*/*E. dispar* é muito pequena comparada a indivíduos infectados por cistos de *Giardia lamblia*, e ovos de *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* por exemplo. Desta forma, a concentração prévia das amostras pode melhorar o rendimento da PCR.

Sanuki *et al.* (1997) utilizaram amostras concentradas por centrifugação em formol-etér. Os cistos possuem paredes de quitina, material muito difícil de ser rompido, assim um

período de digestão maior poderá também render melhores resultados na PCR. No método de Aguirre *et al.* (1997), o lisado foi digerido com proteinase K 24 horas contra 2 horas no outro método. Contudo, a exceção dos controles com trofozoítos, as duas técnicas não renderam reações de PCR positivas. Buscando os possíveis motivos para o fracasso da reação, observamos o material pós-incubação com proteinase K em microscópio ótico. Verificamos que os cistos não haviam se rompido. Acrescentamos mais uma etapa na extração de DNA por estes dois métodos: submetemos previamente as amostras ao congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Verificamos que havia ainda muitos cistos inteiros. Mas apesar disto, alguns se arreventaram e prosseguimos a extração, cujo DNA não rendeu amplicons na PCR. Estes resultados sugerem que os autores destes dois métodos deveriam ter usado amostras fecais com grande concentração de cistos ou mesmo amostras diarréicas. Estas amostras obviamente teriam também uma quantidade maior de trofozoítos e DNA destes trofozoítos livre nas fezes, que no caso não necessitariam de processos extras de rompimentos de cistos. O próprio aquecimento das amostras proporcionaria rompimento das células (ABU-AL-SOUD *et al.*, 2005). No nosso caso, a maioria das amostras fecais utilizadas consistiram de fezes formadas ou pastosas. Poucas foram as amostras diarréicas.

Diante destes resultados, avaliamos nossa PCR com DNA obtido de extração com o kit da Qiagen[®], considerado por alguns autores como o método de escolha para extrair DNA das amebas presente nas fezes (BLESSMANN *et al.*, 2002; LEBBAD & SVARD, 2005; PAGLIA & VISCA, 2004; VERWEIJ *et al.*, 2000). Todas amostras que foram

utilizadas na extração foram amplificadas a contento na PCR. No entanto, o custo do kit para extração de DNA impossibilita sua utilização rotineira. Assim, testamos um método simples de extração de DNA de plasmídeos, o de Lise Alcalina (SAMBROOK *et al*, 1989). O método se mostrou eficiente para extração de DNA das amebas nas fezes e os produtos da PCR se mostraram semelhantes aos obtidos com DNA extraído pelo kit QIAamp®.

Discutimos anteriormente a respeito do rompimento dos cistos para melhorar o rendimento do DNA extraído nas amostras fecais. Utilizamos após etapa de rompimento dos cistos as técnicas do QIAamp e de Lise Alcalina. No entanto, para confirmar sua importância, extraímos DNA pelos métodos de Lise Alcalina e QIAamp com e sem a etapa de rompimento dos cistos. Somente as amostras submetidas ao rompimento dos cistos renderam PCR positivos nas duas técnicas. Estes resultados confirmam nossa suspeita de que amostras procedentes de pacientes com fezes normais ou pastosas contenham menor quantidade de trofozoítos ou mesmo DNA.

Interessantemente, com o método de Lise Alcalina obteve-se rendimento de PCR algumas vezes superior aos obtidos com QIAamp®. Este fato talvez se justifique pela concentração do DNA extraído que na Lise Alcalina é 10 vezes mais concentrado. Ainda pode-se levantar a suspeita de que na Lise Alcalina os cistos sejam mais eficientemente rompidos que no outro método. O hidróxido de sódio (NaOH) está presente em uma concentração muito alta (0,2M), podendo facilitar o rompimento dos cistos. Deve-se ainda salientar que a Lise Alcalina é padronizada para a extração de

plasmídeos (SAMBROOK *et al*, 1989, AUSUBEL *et al.*, 1994) favorecendo a extração do rRNA que em *E.histolytica* é circular e extracromossomal (BHATTACHARYA *et al*, 1998). Este fato pode também ter contribuído na sensibilidade do método.

A especificidade da PCR foi avaliada utilizando amostras com cistos de outros protozoários e ovos de helmintos, além de amostras de fezes negativas para qualquer parasito. Somente amostras positivas para cistos/trofozoítos de *E. histolytica* apresentaram amplicons pós PCR.

Utilizou-se além de fezes, material obtido de aspirado de abscesso hepático de oito pacientes do Instituto Evandro Chagas (Belém, PA) com suspeita de amebíase hepática. Destes, somente cinco foram positivos na PCR. Estes resultados talvez estejam relacionados à falhas no processo de extração devido à presença de coágulos impedindo a extração do DNA ou a inapropriedade do alvo para a reação. Zengzhu *et al.* (1999) analisando o diagnóstico de 43 pacientes com suspeita de amebíase hepática, concluíram que o rRNA não deve ser o alvo para diagnóstico por PCR nestes pacientes. De acordo com os autores o melhor alvo seria um fragmento gênico de 100 pb derivado de uma proteína de 30 kDa sinalizadora de infecção hepática (TACHIBANA *et al.*,1990). Os autores encontraram 100% de sensibilidade para a PCR cujo alvo foi a proteína de 30 kDa contra 34% da PCR para o rDNA.

Uma vez determinada a melhor metodologia para extração de DNA partiu-se para a padronização da PCR. Neste contexto avaliou-se a procedência da *Taq* DNA polimerase e estringência da reação.

Diferentes marcas comerciais de *Taq* DNA polimerase, podem render diferenças nos resultados de uma PCR, havendo algumas vezes necessidade da utilização de facilitadores da amplificação como BSA, caseína, formamida (ABU-AL-SOUD *et al.*, 2005) e polivinilpolipirrolidona (PVPP) (EVANGELOPOULOS *et al.*, 2001; VERWEIJ *et al.*, 2004). Alguns tipos de DNA polimerases são mais sensíveis à inibição que outras, diferindo na processividade e fidelidade (WILSON, 1997). Avaliamos o desempenho de 3 diferentes marcas de *Taq* DNA polimerase, Promega[®], Invitrogen[®] e Pharmacia[®], todas apresentaram resultados satisfatórios.

A estringência da reação foi avaliada através da temperatura de anelamento dos iniciadores ao DNA alvo. A temperatura calculada como ideal para a PCR foi de 57° C, contudo nesta temperatura havia sempre bandas espúrias. Temperaturas variando de 57 à 65° C foram utilizadas na reação numa tentativa de diminuir estas interferências. O perfil da PCR continuou o mesmo. Contudo a presença destas bandas não interferiu na leitura dos resultados da PCR.

A concordância entre a microscopia ótica e a PCR foi regular, de 0.515, segundo escala de concordância Kappa. A especificidade da PCR em relação à microscopia foi boa, entretanto a sensibilidade foi de 70%, considerada baixa para uma técnica tão sensível como a PCR. Resultados similares a estes foram observados por Rayan (2005).

No entanto deve-se considerar, que a microscopia não deve consistir padrão de referência para diagnóstico entre *E. histolytica* e *E. dispar*. A maioria dos trabalhos que

comparam a microscopia com o ELISA, por exemplo, mostram resultados similares aos do presente trabalho para a PCR quando se utiliza como padrão a microscopia ótica (GONZÁLES-RUIZ *et al.*, 1994b; SHARMA *et al.*, 2003; TANYUSKEL *et al.*, 2005).

A identificação por microscopia ótica em outros estudos indica que esta possui 60% de sensibilidade comparado a cultura e a isoenzimas (HAQUE *et al.*, 1998) e 39% de sensibilidade e 96% de especificidade comparado aos ELISA da Techlab[®] e valor preditivo positivo de 5%, produzindo resultados falso-positivos, abaixando a sensibilidade das outras técnicas a ela comparadas (NESBITT *et al.*, 2004).

Muitos são os fatores que influenciam na precisão do diagnóstico microscópico para a identificação correta do complexo de amebas. As amostras devem ser transportadas em conservantes, caso contrário a execução do exame deve se dar no menor período de tempo possível. A microscopia apresenta maior porcentagem de detecção em amostras preservadas nos diversos conservantes como Schaudinn, SAF (formol-etil-acetato), MIF (mercúrio-iodo-formol), do que em amostras não conservadas (SCHOLTEN & YANG, 1974). No caso do líquido de Schaudinn ele é tóxico, pois apresenta mercúrio em sua composição (HOREN, 1981) sendo a sua manipulação perigosa à saúde dos profissionais e do paciente. O líquido conservante de preferência seria a formalina. O conservante MIF de Blagg *et al.* (1955), possui formalina 10% que conserva as formas císticas dos protozoários e o iodo que pode ser adicionado posteriormente à etapa de centrifugação da técnica que permite a diferenciação das espécies de amebas existentes no trato intestinal. O mercúrio-cromo é adicionado como

sinal de advertência aos pacientes. A glicerina é outro componente adicionado a mistura com a finalidade de clarificar cistos e ovos, facilitando sua identificação.

A coleta e a forma de utilização do material para diagnóstico constitui outro fator que influencia na identificação pelo microscópico de *E. histolytica* e *E. dispar*. Gonin & Trudel (2003), estudando comparativamente técnicas de diagnóstico para amebíase, selecionaram 11 pacientes que apresentaram fezes positivas à microscopia ótica para *E. histolytica/E. dispar* pela técnica de concentração em formol-étil-acetato (SAF). Na segunda análise destas amostras pelo ELISA Techlab[®] e pela PCR para o rDNA estas amostras revelaram-se negativas. Estes resultados talvez estejam relacionados à coleta do material, que poderia ter ocorrido no período negativo de formação de cistos. Poderia se relacionar também ao fato do material ter sido concentrado para diagnóstico morfológico e não para o ELISA e a PCR.

Outro problema é a presença no intestino humano de várias outras amebas comensais. Assim o diagnóstico de certeza depende muito do laboratorista que deve ser experiente e consciente. Muitos laboratoristas baseiam-se em figuras de livros para o diagnóstico, tornando os resultados falso-positivos para *E. histolytica* uma constante (VERWEIJ *et al.*, 2003). Geralmente os laboratórios não utilizam micrômetro para medir os cistos de *E. hartmanni*, uma ameba comensal similar a *E. histolytica*. Resultados falsos são comuns. Outra ameba muito parecida com a *E. histolytica* é a *E. moshkovskii*, esta ameba era considerada um tipo não patogênico da *E. histolytica* até pouco tempo. Estudos têm demonstrado uma significativa frequência desta ameba no intestino humano (ALI *et al.*, 2003; PARIJA & KHAIRNAR, 2005). Outra possibilidade seria a de

infecção por amebas que não são comensais ou parasitas do homem e sim de porcos e macacos como *E. polecki* e *E. chattoni*, mas que ocasionalmente podem ser detectadas nas fezes de humanos (VERWEIJ *et al.*, 2003), provavelmente devido à manipulação desses animais por criadores em fazendas e em zoológicos (VERWEIJ *et al.*, 2001).

Os casos de infecção humana com *E. polecki* são considerados raros, exceto na Papua Nova Guiné em que a taxa de prevalência chega a ser maior que 30% (DESOWITZ *et al.*, 1986).

Um estudo realizado em Cuba por Ferrer *et al.* (1999) demonstrou que uma pequena porcentagem de 96 técnicos entrevistados dos Laboratórios da província de Cienfuegos tinham conhecimento das características morfológicas necessárias para se identificar corretamente os estágios de pré-cisto (56,8% dos técnicos), cisto (61,7%) e trofozoítos (35,9%). Apenas 38,9% dos técnicos selecionaram um conjunto de características morfológicas corretas para identificar leucócitos. A consequência foi que ao se determinar a prevalência de *E. histolytica* em Cuba por coproantígenos (LUACES *et al.* 1993), os níveis de detecção foram baixíssimos. O treinamento exaustivo desses profissionais, portanto, deve ser objetivado pelas empresas de laboratórios particulares dos centros urbanos e do governo a fim de se almejar a melhora no diagnóstico do complexo de amebas em questão e também de outras infecções intestinais.

Procurando confirmar as suspeitas acima referidas, a possibilidade de inibição da PCR por substâncias presentes nas fezes foi avaliada.

A inibição na PCR pode ocorrer por bloqueio dos sítios ativos da enzima *Taq* DNA polimerase (ABU AL-SOUD *ET AL.*, 1998) ou através de componentes da dieta e da microbiota intestinal, como proteases bacterianas e nucleases tanto quanto debrís celulares e efeitos físico-químicos que previnam a amplificação. Stacy-Phipps *et al.* (1995) e Wilson (1997) reduziram os inibidores fecais por diluição das amostras de DNA. Estes autores sugerem que amostras diarréicas apresentam baixo nível de inibidores devido ao curto tempo de trânsito intestinal.

Para verificar a presença de inibidores foram utilizadas cinco amostras positivas na microscopia e negativas na PCR. Estas amostras foram submetidas a um novo PCR para amplificar um segmento do gene humano da cadeia leve da miosina. Destas cinco amostras, três foram positivas. Estes resultados reforçam as discussões acima a respeito de diagnósticos falso-positivos e também no que se refere à inibição da PCR por substâncias presentes nas fezes. Outra possibilidade é material com quantidade insuficiente de DNA ou por problemas na extração ou por deficiência no número de parasitos.

Das noventa amostras utilizadas para PCR, 41 foram diagnosticadas pela técnica de ELISA para coproantígenos. A PCR mostrou uma boa concordância com o ELISA, todavia deixou de diagnosticar cinco amostras que foram positivas para *E. histolytica* no ELISA. Uma dessas cinco amostras foi identificada como *E. dispar* pela PCR. Segundo Haque *et al.* (1998) o método *E. histolytica* II test da Techlab[®] é designado para ser específico para *E. histolytica*, contudo na prática pode ocorrer reação cruzada entre *E. histolytica* e *E. dispar*. A especificidade da PCR nos permite afirmar que esta amostra

constituiu um falso positivo no ELISA. Resultados similares foram encontrados por outros pesquisadores (DELIALIOGLU *et al.*, 2004; FURROWS *et al.*, 2004; GONIN & TRUDEL, 2003, ROY *et al.*, 2005; TANYUKSEL *et al.*, 2005). A segunda amostra foi positiva para *E. dispar* e *E. histolytica*. Das técnicas padronizadas na literatura para diagnóstico das duas espécies de amebas, apenas a PCR possui a capacidade de detectar infecções mistas (EVANGELOPOULOS *et al.*, 2000; HUSTON *et al.*, 1999).

A baixa sensibilidade da PCR em relação ao ELISA pode estar relacionada à baixa especificidade da ELISA. Contudo, podemos ainda acrescentar alguns fatores associados à manipulação do material em estudo que poderiam interferir na sensibilidade da PCR versus ELISA.

Após execução do exame das fezes para o ELISA, sobrou pouco material em algumas amostras para ser submetido à concentração pelo método do formol-etér. Restava algumas vezes uma alíquota mínima de fezes para se executar a PCR. O exame deste sedimento muitas vezes não revelava cistos nem trofozoítos de amebas. Mesmo assim o material foi processado para extração, pois poderia haver trofozoítos e fragmentos de DNA com o alvo a ser amplificado.

Algumas das amostras negativas ficaram congeladas a -20°C por até 20 meses até o momento da PCR, o que pode ter interferido no processo de amplificação. Contudo devemos ressaltar que alguns dos resultados positivos na PCR provieram de amostras congeladas por vários meses.

Entre as 23 amostras negativas no ELISA, 3 foram positivas na PCR para *E. dispar*, pois os anticorpos monoclonais do *Entamoeba histolytica* II Test apenas detecta os epitopos da lectina Gal/GalNac de *Entamoeba histolytica*, dando resultado negativo quando a ameba presente é *E. dispar*.

Comparando a PCR com o ELISA, não houve nenhum resultado falso-negativo refletindo a grande especificidade da técnica (100%) concordando com os achados de vários autores (ACUNA-SOTO *et al.*, 1993; BLESSMANN *et al.*, 2002 VERWEIJ *et al.*, 2000; VERWEIJ *et al.*, 2004).

O método de coproantígenos pode não ser um bom padrão de referência para comparação de novas técnicas de diagnóstico. Pillai *et al.*, (1999) em um estudo epidemiológico no Canadá demonstrou a maior sensibilidade do Alexon Kit[®] em relação ao *Entamoeba* test da Tech lab[®]. Gatti *et al.* (2002) em um estudo de incidência de *E. histolytica/E. dispar* no Equador, encontraram uma sensibilidade do *Entamoeba* test da Tech lab[®] de 14,2% contra 54,5% do Alexon kit[®] tendo como padrão isoenzimas. A sensibilidade das duas técnicas foi menor que a sensibilidade da microscopia ótica (66%).

Isoenzimas em *E. histolytica/E. dispar* constitui o padrão-ouro de diagnóstico na identificação das espécies. No entanto, é uma técnica laboriosa e dependente de cultura, impossibilitando sua execução em muitos laboratórios. Assim não se pôde realizar o diagnóstico das amostras fecais por zimodema. Contudo na padronização da PCR utilizamos 10 amostras de culturas previamente caracterizadas por isoenzimas

(BARRAL DE MARTINEZ *et al.*, 1996). A PCR para o rDNA tendo como padrão a técnica de Isoenzimas, obteve uma sensibilidade e especificidade de 100%.

Em análise, dos métodos de diagnóstico para identificação de *E. histolytica* e *E. dispar*, a PCR se mostrou mais específica, a microscopia mais sensível e a técnica de coproantígenos apresentou melhor especificidade que a microscopia e maior sensibilidade que a PCR.

Interessante é que apesar da PCR ter apresentado menor sensibilidade em trabalhos experimentais de campo (FURROWS *et al.*, 2004, HAQUE *et al.*, 1998) ela se revela a técnica mais sensível quando da padronização em laboratório (BRITTEN *et al.*, 1997; FREITAS *et al.*, 2003; MIRELMAN *et al.*, 1998,). Em vários estudos a PCR foi capaz de identificar as menores quantidades de trofozoítos, chegando a menos que um trofozoíto por reação. Enquanto no método de coproantígenos esta sensibilidade varia de 100 a 1000 trofozoítos por poço (BRAGA *et al.*, 2001; MIRELMAN *et al.*, 1998; HAQUE *et al.*, 1998). Estes dados sugerem que o problema seria o padrão utilizado para comparação com a PCR, muito pouco específico.

Assim a PCR é uma técnica promissora principalmente considerando custo e especificidade. Estudos nesta área devem continuar buscando sua padronização e otimização.

7 – Conclusões

- A PCR identificou infecções por *E. histolytica*, *E. dispar* e infecções mistas em amostras fecais, mostrando sua aplicabilidade como método diagnóstico;
- Amostras conservadas em formol e etanol produziram resultados positivos na PCR, podendo estes conservantes ser utilizados para transporte de material para estudos epidemiológicos;
- A microscopia ótica e o ELISA não se mostraram padrões adequados para determinar a eficiência diagnóstica da PCR.

Referências Bibliográficas

ABU AL-SOUD, W.; OUIS, I. S.; LI, D.Q.; JUNGH, S.A.L.; WADSTROM, T. Characterization of the PCR inhibitory effect of bile to optimize real-time PCR detection of *Helicobacter* species. *Immun. Med. Microbiol.*, v. 44, p. 177–182. 2005

ABU AL-SOUD, W.; RADSTRÖM, P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 64, n. 10. 1998

ACUNA-SOTO, R.; SAMUELSON, J.; GIROLAMI, P.; ZARATE, L.; MILLAN-VELASCO, F.; SCHOOLNICK, G. & WIRTH, D. Application of polymerase chain reaction amplification to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.48, n.1, p.58-70. 1993.

AGUIRRE, A.; WARHUST, D.C.; GUHL, F. & FRAME, I.A. Polymerase chain reaction-solution hybridization enzyme-linked immunosorbent assay (PCR-SHELA) for the differential diagnosis of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica* *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.89, p.187-188. 1995

ALI, I.B.K.M.; HOSSAIN, M. B.; ROY, S.; AYEK-KUMI, P. F.; PETRI, W. A. Jr; HAQUE, R. H.; CLARK, C. G. *Entamoeba moshkovskii* infections in children in Bangladesh. *Emerging infectious diseases*, v. 9, n. 5, p. 580-584. 2003

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SEIDMAN, J.G.; SMITH J.A & TRUHL K. *Currents protocols in Molecular biology*, USA: ed.Wiley, 1994. 23 suplementos, v.1

BARRAL DE MARTINEZ, A.M.; GOMES, M.A.; VIANA, J. C.; ROMANHA, A. J.; SILVA E. F. Isoenzyme profile as parameter to differentiate pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* in Brazil. *Rev.Inst. Med. Trop. São Paulo.*, v.38, n. 6, p. 407-412. 1996

BENETTON, Maria Linda Flora de Novaes. *Estudo epidemiológico para identificação da fatores de risco para amebíase na cidade de Manaus-Amazonas*. 2003. 169 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

BHATTACHARYA, A.; SATISH, S.; BAGCHI, A. & BHATTACHARYA, S. The genome of *Entamoeba histolytica*. *Int. J. Parasitol.* v.30, p. 401-410. 2000

BHATTACHARYA, S.; SOM, I. & BHATTACHARYA, A. The ribosomal plasmids of *Entamoeba*. *Parasitol. Today*, v.14, n.5, 181-185. 1998

BLAGG W., SCHLOEGEL, E.L.; MANSOUR, N.S. & KHALAF, G.I. A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helmint eggs in feces. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.4, p. 23-28. 1955

BLESSMANN, J.; BUSS, H., TON NU, P. A.; DINH, B. T.; VIET NGO, Q. T.; VAN, A. L.; ABDALLA, M. D.; JACKSON, T. F. H. G.; RAVDIN, J. I. & TANNICH, E. Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. *J.Clin. Microbiol*, v.40, p.4413-4417. 2002

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.*, v. 66, n. 5, p.578-583. 2002

BRAGA, L. L. B. C.; GOMES, M. L.; SILVA, M. W.; PAIVA, C.; SALES, A.;MANN, B. J. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections as detected by monoclonal antibody in an urban slum in Fortaleza, Northeastern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 34, n. 5, p. 467-471. 2001

BRAGA, L. L.; MENDONÇA, Y.; PAIVA, C. A.; SALES, A.; CAVALCANTE, A. L. M.; MANN, B. J. Seropositivity for and intestinal colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in individuals in Northeastern Brazil. *J.Clin. Microbiol*, v.36, n.10, p.3044-3045. 1998

BRITTEN, D.; WILSON, S.M.; McNERNEY R.; MOODY, A.H.; CHIODINI, P.L. & ACKERS, J. P. An improved colorimetric PCR-based method for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in feces. *J.Clin. Microbiol*, v.35, n.5, p. 1108-1111. 1997

BRUMPT, E. Etude sommaire de l'*Entamoeba dispar* n. sp. Amibe a kystes quadrinuclees parasite de l'homme. *Bull. Acad. Med.* v. 94, p. 943-952. 1925

CABELLERO-SALCEDO,A.; VIVEROS-ROGEL,M. *et al.* Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.50, p.412-9. 1994

CHACÍN-BONILLA, L. & BONPART, D. A seroepidemiological study of amebiasis in adults in Maracaibo, Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 30, n. 6, p. 1201-1205. 1981

CLARK, C.G. & DIAMOND, L.S. Ribosomal RNA genes of "pathogenic" and "non-pathogenic" *Entamoeba histolytica* are distinct. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.49, p. 297-302. 1991

COUNCILMAN, W.T. & LAFLEUR, H.A. Amoebic dysentery. *Bull. Johns. Hopkins Hosp. Rept.*, v.2 , p. 395-548. 1891

CRAIG, C.F. Observations upon amebas infecting the human intestine with a description of two species, *Entamoeba coli* and *Entamoeba dysenterie*. *Am. Med.*, v. 9, p 854-861, p. 897-903, p.936-942. 1905

DELIALIOGLU, N.; ASLAN, G.; SOZEN, M.; BABUR, C.; KANIK, A.; EMEKDAS, G. Detection of *Entamoeba histolytica* /*Entamoeba dispar* in stool specimens by using enzyme-linked immunosorbent assay. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 99, n.7, p.769-772. 2005

DESOWITZ, R. S.; BARNIZ, G. *Entamoeba polecki* and other intestinal protozoa in Papua New Guine Highland Children. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.80, p.399-402. 1986

DIAMOND, L.S. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *Entamoeba histolytica*-like amebae. *J. Parasitol.*,v.54, n.5, p. 1047-1056. 1968

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.*, v.40, n.3, p.340-344. 1993

DIAMOND, L.S., HARLOW, D.R. & CUNNICK, C. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.72, p. 431-432. 1978

DOGANCI, L.; TANYUSKEL, M.; DOGANCI, T. Accurate diagnosis is essential for amebiasis. *World J. Gastroenterol.*, v. 10, n.8, p.1231-1232. 2004

EVANGELOPOULOS, A.; LAGAKIS, N.; VAKALIS N. Microscopy, PCR and ELISA applied to the epidemiology of amoebiasis in Greece. *Parasitol. Int.*, v.50, p.185-189. 2001.

EVANGELOPOULOS, A.; SPANAKOS, G.; PATSOULA, E.; VAKALIS, N. & LEGAKIS, N. A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.94, p. 233-240. 2000.

FERRER, M. A. F.; VALDEZ, L. S.; IGLESIAS, H. M.; GOODRIGDE, I.M.; FERNÁNDEZ, F. N.; LÓPEZ, Y. N.; GALINDO, L. F. Sobrediagnóstico microscópico de amebiasis intestinal: encuesta a técnicos de laboratorio. *Rev. Cubana Invest. Biomed.*, v. 18, n. 3, p. 197-202. 1999

FREITAS, M. A. R.; VIANNA, E. N.; MARTINS, A. S.; SILVA, E. D.; PESQUERO, J.L.; GOMES, M.A. A single step duplex PCR to distinguish *Entamoeba histolytica* from *Entamoeba dispar*. *Parasitology*, v. 128, p.625-628. 2004

FURROWS, S.J.; MOODY, A.H.; CHIODINI, P.L. Comparison of PCR and antigen detection methods for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J. Clin.Pathol.*, v.57, n. 12, p. 1264-1266. 2004

GATTI, S.; SWIERCZYNSKI, G.; ROBINSON, F.; ANSELMINI, M.; CORRALES, J.; MOREIRA, J.; MONTALVO, G.; BRUNO, A.; MASERATI, R.; BISOFFI, Z.; SCAGLIA, M. Amebic infections due to the *Entamoeba histolytica-Entamoeba dispar* complex: a study of the incidence in a remote rural área of Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.67, n. 1, p. 123-127. 2002

GIBSON, J. R.; SUTHERLAND, K., OWEN, R.J. Inhibition of DNase activity in PFGE analysis of DNA from *Campylobacter jejuni*. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.19, p.357-358. 1994

GOMES, M. A.; PESQUERO, J. B.; FURST, C.; VALLE P. R.; SILVA, E. F. An improved method to distinguish *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Parasitology*, v. 119, p. 359-362. 1999

GOMES, M.A.; MARTINS, M.S.; COSTA, A.O.; SILVA, E.F. Influence of bacteria upon cytopathic effect and erythrophagocytosis of different axenic strains of *Entamoeba histolytica*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.37, n.3, p.197-200. 1995

GOMES, M.A.; MELO, M.N.; MACEDO, A.M.; PENA, G.P.; CALIARI, M.V. & SILVA, E.F. Characterization of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by biological, biochemical and molecular parameters. *Arch. Med. Res.*, v. 31, p.49-50. 2000

GOMES, M.A.; SILVA, E.F.; MACEDO, A.M.; VAGO, A.R. & MELO M.N. LSSP-PCR for characterization of strains of *Entamoeba histolytica* isolated in Brazil. *Parasitology*, v. 114, p. 517-520. 1997

GONIN, P. & TRUDEL L. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* isolates in clinical samples by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *J.Clin. Microbiol*, v.41, n.1, p.237-241. 2003

GONZÁLEZ-RUIZ, A.; HAQUE, R.; REHMAN, T.; AGUIRRE, A.; JARAMILLO, C.; CASTAÑÓN, G.; HALL, A.; GUHI, F.; RUIZ-PALACIOS, WARHURST, G.; MILES, M.A. A monoclonal antibody for distinction of invasive and non-invasive clinical isolates of *Entamoeba histolytica*. *J.Clin. Microbiol*, v. 30, p. 2807-2813. 1992

GONZALEZ-RUIZ, A.; HAQUE, R; AGUIRRE, A., CASTAFION, G.; HALL, A., GUHL, F. RUIZ-PALACIOS,M; MILES, A.; WARHURST, D. C. Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. *J.Clin. Microbiol* v.47, p. 236-239. 1994-a

GONZALEZ-RUIZ, A.; HAQUE, R.; REHMAN, T.; AGUIRRE, A; MAY, A; JUL, F.; WARHURST, D. C.; MILES, M. A. 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*, v.32, n. 4, p. 964-970. 1994-b

HAQUE, R., DUGGAL, P.; ALI, I. M.; HOSSAIN, M. B.; MONDAL, D.; SACK, R. B.; HAQUE, R., MOLLAH, N. U. I.; ALI, K. M., ALAM, K.; EUBANKS, A.; LYERLY, D. ; W. A. PETRI, JR.. Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and resistance to amebiasis in Bangladesh children. *J. Infect. Dis.*, v. 186, p.547-552. 2002. I

HAQUE, R.; ALI, I. M.; PETRI, W. A. JR. Prevalence and immune response to *Entamoeba histolytica* infection in preschool children in Bangladesh. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.60, n. 6, p. 1031-1034. 1999

HAQUE, R.; ALI, K.M.; AKTHER & PETRI, W.A.JR. Comparison of PCR, isoenzyme analysis and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J.Clin. Microbiol*, v.36, n.2, p.449-452. 1998

HAQUE, R.; DUGGAL, P.; ALI, I. M.; HOSSAIN, M. B.; MONDAL, D.; SACK, R.B.; FARR, B. M.; BEATY, T. H.; W. A. PETRI, JR. Innate and acquired resistance to amebiasis in Bangladesh Children. *J. Infect. Dis.*, v. 186, p.547-542. 2002

HAQUE, R.; KRESS, K.; WOOD, S.; JACKSON, T.F.H.G.; LYERLY, D.; WILKINS, T. & PETRI, W.A. JR. Diagnosis of pathogenic *Entamoeba histolytica* infection using a stool ELISA based on monoclonal antibodies to the galactose-specific adhesin. *J. Infect. Dis.* v.167, p.247-249. 1993

HAQUE,R.; NEVILLE, L.M.; HAHN, P. & PETRI, W.A. JR. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. *J.Clin. Microbiol*, v. 33, n.10, p.2558-2561. 1995

HOFFMAN, W.A.; PONS, J.A. & JANER, J.L. The sedimentation–concentration method in schistosomiasis *mansoni*.. *J. Publ. Hlth* ., v.9, p.281-298. 1934

HONMA, M.; OHARA, Y.; MURAYAMA, H.; SAKO, K.; IWASAKI, Y. Effects of fixation and varying target length on the sensitivity of PCR for detection of human T-cell Leukemia Virus type I proviral DNA in formalin fixed tissue section. *J.Clin. Microbiol*, v. 31, p.1799-1803. 1993

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

HUSTON, C.D.; HAQUE, R. & PETRI JR., W.A. *Experts Reviews in Molecular Medicine*. 1999. Disponível em <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk> ISSN: 1462-3994. Acesso em :fev. 2003

JACKSON, T.F.H.G. & RAVDIN, J.I. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections. *Parasitol. Today*, v. 12, n.10, p. 405-408. 1996

KATZWINKEL-WLADARSCH, S; LOSCHER, T. & RINDER, H. Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from stool specimens. *Am Soc Trop Med Hyg*, v. 51, p. 115-118. 1994

KEBEDE, A.; VERWEIJ, J.J.; PETROS, B. & POLDERMAN, A.M. Misleading microscopy in amoebiasis. *Trop. Med. Int. Health*, v.9, n.5, p.651-652. 2004

KOCH, R. & GRAFFIKI, G. Bericht über die Thatigkeit der zur Erforschung der Cholera im Jahre 1883 nach Egypten und Indien Ensandten Komission. *Arb. K. Gesundth Amt. Berlin*. 1887

LEBBAD, M. & SVARD, S. G. PCR differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from patients with amoeba infection initially diagnosed by microscopy *Scan J Infect Dis*, v. 37, p.680-685. 2005

LÖSCH, F.A. Massenhafte Entwicklung von Amoeben in Didkdarm. *Arch.F.Path. Anat.*, v.65, p.196-211. 1875. In : Kean, B.H., Mott, Q.E. & Russel. A. J. *Trop. Med. Parasit. Classic Investigations. Trop. Med. Parasit* (1): 71-19, 1978.

LUACES, A. L.; OSORIO, L. M.; BARRETT, A.J. A new test for infection by *Entamoeba histolytica* infection. *Parasitol. Today*, v. 9, n. 2, p. 69-71. 1993

LUTZ, A.O. *Schistosomum mansoni* e a schistosomose, segundo observações feitas no Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.11, p. 121-155. 1919

MARTINEZ-PALOMO, A. Biology of Amebiasis: Progress and perspectives in biology of parasitism. Ed. P.T. England e A. Sher, Alan, R. Liss, New York, USA, p.61-76, 1988

MIRELMAN, D.; BRACHA, R.; ROZEMBLATT, S. & GARFINKEL, L. Repetitive DNA elements characteristic of pathogenic *Entamoeba histolytica* strains can also be detected after polymerase chain reaction a cloned non-pathogenic strain. *Infect. Immun.*, v. 58, p.1660-1663. 1990

MIRELMAN, D.; NUCHAMOVITZ, Y. & STOLARSK, T. Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. *J.Clin. Microbiol*, v.35, n.9, p.2405-2407. 1997

MONTEIRO, L.; BONNEMAISON, D.; VEKRIS, A.; PETRY, K.G.; BONNET J., VIDAL, R.; CABRITA, J. & MÉGRAUD, F. Complex polyssaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J.Clin. Microbiol*, v.35, n.4, p.995-998. 1997

MORAN, P.; RAMOS, F.; RAMIRO, M.; CURIEL, O.; GONZÁLEZ, E.; VÁLÁDEZ, A.; GÓMEZ, A.; GÁRCIÁ, G.; MELENDRO, E. I.; XIMÉNEZ, C. *Entamoeba histolytica* and or/ *Entamoeba dispar*: infection frequency in HIV+/AIDS patients in México city. *Exp. Parasitol.*, v. 110, p. 331-334. 2005

NESBITT, R. A.; MOSHA, F. W.; KATKI, H. A.; ASHRAF M.; ASSENGA, C.; LEE, C. M. Amebiasis and comparison of microscopy to ELISA technique in detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *J. Natl. Med. Assoc.*, v. 96, n.5, p.671-677. 2004

ÑUNEZ, Y.O.; FERNÁNDEZ, D.T.N.; SILVA, J.A.; MONTANO I.; MAESTRE J.L. & FONTE, L. Multiplex polymerase chain reaction amplification and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* DNA from stool samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.64, p.293-297. 2001

PAGLIA, M.G. & VISCA, P. An improved PCR-based method for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in formalin-fixed stools. *Acta Trop.*, v. 92, p. 273-277. 2004

PAI, H.H.; KO, Y.C.; CHEN, E.R. Cockroaches (*Peripalmeta americana* and *Blattella germanica*) as potential mechanical disseminators of *Entamoeba histolytica*. *Acta Trop.*, v. 87, p.355-359. 2003

PARIJA, SC; KHAIRNAR K.J. *Entamoeba moshkovskii* and *Entamoeba dispar*-associated infections in pondicherry, India. *Health Popul Nutr.*, v.23, n.3, p.292-295. 2005

PETRI, W. A.; JACSON, T.F.G.H.; GATHIRAM, V.; KRESS, K.; SAFFER, L.D.; SNODGRASS, T.L., CHAPMAN, M.D.; KEREN, Z. & MIREKMAN, D. Pathogenic and nonpathogenic strains of *E. histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. *Infect. Immun.*, v.58, p.1802-1806. 1990

PILLAI, D. R.; KEYSTONE, J.S.; SHEPPARD, D.C.; MAC LEAN, D.; MAC PHERSON, D. W.; KAIN, K. C. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: Epidemiology and comparison of diagnostic methods in a setting of nonendemicity. *Clin. Infect. Dis.*, v.29, p.1315-1318. 1999

PINHEIRO, S. M. B.; CARNEIRO, R. M.; ACA, I. S.; IRMÃO, J. I.; MORAIS 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.*, v. 70, n. 2, p. 221-224. 2004

PÓVOA, M. M.; GOMES, J. E.; SILVA, M.C.M.; BICHARA, C. N. C.; ESTEVES, P.; GABBAY, Y. B.; MACHADO R. L. D. Diagnóstico de amebíase intestinal utilizando métodos coproscópicos e imunológicos em amostra da população da área metropolitana de Belém, Pará, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v.16, n.3, p. 843-846. 2000

RAMOS, F.; MORAN, P.; GONZÁLEZ, E. GÁRCÍA, G.; RAMIRO, M.; GÓIEZ; A.; CARIE, M.; LEÓN, G.; MELENDRO, E. I.; VÁLÁDEZ, A.; XIMÉNEZ, C. *Entamoeba histolytica* and *entamoeba dispar* : prevalence infection in a rural mexican community. *Exp. Parasitol.*,v. 110, p. 327-330. 2005

RAMOS, F.; ZURABIAN, R.; MORAN, P.; RAMIRO, M.; GOMEZ, A.; CLARK C.G.; MELENDRO, E.I., GARCIA, G. & XIMENEZ , C. The effect of formalin fixation on the polymerase chain reaction characterization of *Entamoeba histolytica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*, v. 93. p. 335-336. 1999

RAVDIN, J. I. *Entamoeba histolytica*: from adherence to enteropathy. *J. Infect. Dis.*, v. 159, n. 3, p. 420-429. 1989

RAVDIN, J.I. Amebiasis. *Clin. Infect. Dis.*, v.20, p.1453-1466. 1995

RAVDIN, J.L. *Entamoeba histolytica* (Amebiasis). 2000. In: GL Mandel , J.E. Bennett, R. Dolin (eds), *Principles and Practice of Infectious diseases*, 5^a ed., Churchill Livingstone, Philadelphia, p. 2798-2810

RAYAN, H.Z. Microscopic overdiagnosis of intestinal amoebiasis. *J. Egypt Soc. Parasitol.*, v.35, n. 3, p.941-951. 2005

RITCHIE, L.S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bull. U.S. Army. Med. Dept.* v. 8, p. 326. 1948

RIVERA, W.L., TACHIBANA, H.; SILVA-TAHAT, M.R.A.; UEMURA, H. & KANBARA H. Differentiation of *Entamoeba histolytica* e *E. dispar* from cysts present in stool specimens by polymerase chain reaction: is field application in the Philippines. *Parasitology Research*, n 3, v.82, p.585-589. 1996

ROY, S.; KABIR, M.; MONDAL, D.; ALI, I.B.K.M.; PETRI JR., W.A. ; HAQUE, R. Real time –PCR Assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J.Clin. Microbiol.*, v.43, n.5, p.2168-2172. 2005

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATS, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2 ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor , v.1. 1989

SANTOS, F. R.; PENA, S. D.; EPPLEN, J.T. Genetic and population studies of a y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non- isotopic technique. *Hum Genetic*, v.90, p.655-656. 1993

SANTOS, Helena Lúcia Carneiro. *Diagnostico laboratorial da amebíase:detecção e diferenciação simultânea da Entamoeba histolytica e Entamoeba dispar por ensaio imunoenzimático e multiplex PCR*. 2005. 87 p. Dissertação (Mestrado em patologia experimental) - Curso de pós-graduação em Patologia, Universidade federal fluminense, Niterói, 2005.

SANUKI, J.I.; ASAI, T.; OKUZAWA, E.; KOBAYASHI, S. & TAKEUSHI, T. Identification of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* cysts in stool by polymerase chain reaction. *Parasitol. Res.*, v. 83, p. 96-98. 1997

SARGEAUNT, P.G., WILLIAMS, J.E.; & GRENE, J.D. The differentiation of invasive of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop.. Med. Hyg.* v.72, p.519-521. 1978

SCHAUDINN, F. Untersuchungen uber die Fortplanzung einiger Rhizopoden. *Arb. a.d. Kaiserl.Gesunch Amte*.v.19, p.547-576. 1903

SCHOLTEN, T. H.; YANG, J. Evaluation of unpreserved and preserved stools for the detection and identification of intestinal parasites. *Am. J.Clin. Pathol.*, v.62, p. 563-567. 1974

SHARMA, A.K.; CHIBBAR,S.; BANSAL, G.; KAUR, U.; VOHRA, H. Evaluation of newer diagnostic methods for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* in a endemic area. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 97, p. 396-397. 2003

SHARMA, M. P.; AHUJA, V. Amoebic Liver abscess. *JIACM*, v. 4, n. 2, p.107-111.2003

SILVA, E. F.; GOMES, M. A.; CARVALHO, M. G. Avaliação das técnicas de hemoaglutinação indireta e imunofluorescência indireta no diagnóstico da amebíase intestinal. *Rev. Pat. Trop.*, v. 25, n.1, p.5-11. 1996

SILVA, M.C.M.; MONTEIRO, C.S.P.; ARAÚJO. B.A.V.; SILVA, J. V.; POVOA, M.M. Determinação da infecção por *Entamoeba histolytica* em residentes da área metropolitana de Belém, Pará, Brasil, utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígenos *Cad. Saúde Pública*, v. 21, n.3, p.969-973. 2005.

SOARES, C.A.; OLIVEIRA, J.B.; BRITO, M.D.C. Infecção natural por *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 em *Euphractus sexcinctus* (tatu) mantidos em cativeiro *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, n.3. 2000

SPURKLAND, A.; KNUTSEN, I.; MARKUSSEN,G.; VARTDAL, F.; EGELAND, T.; THORSBY, E. HLA matching of unrelated bone marrow transplant pairs: direct sequencing of in vitro amplified HLA-DRB1 and DQB1 genes using magnetic beads as solid support. *Tissue Antigens*, v.41, p.155-164. 1993

SRIVASTAVA, S.; BHATTACHARYA, S.; PAUL, J. Species-and strain-specific probes derived from repetitive DNA for distinguishing *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Exp. Parasitol.*,v. 110, p.303-308. 2005

STACY-PHIPPS, S.; MECCA, J. J.; WEISS, J.B. Multiplex assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during course of infection. *J.Clin. Microbiol*, v. 33, n. 5, p. 1054-1059. 1995

STANLEY, S. L. Amoebiasis *Lancet*, v.361, p.1025–1034. 2003

STANLEY, S. L. J.; BECKER, C.; KUNS-JENKINS, L. & LI, E. Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , v. 87,p. 4976-4980. 1990

TACHIBANA, H.; KOBAYASHI, S.; KATO Y.; NAGAKURA, K.; KANEDA, Y.; TAKEUCHI, T. Identification of a pathogenic isolate-specific 30,000- M_r antigen of *Entamoeba histolytica* by using a monoclonal antibody. *Infect. Immun.*, v. 58, p.955-960. 1990

TANNICH, E.; BRUCHAUS, I.; WALTER R.D, & HORSTMANN, R.D. Pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*: identification and molecular cloning of an iron-containing superoxide dismutase. *Mol. Biochem. Parasitol.*,v. 49, p.61-72. 1991

TANNICH, E.; HORSTMANN, R.D; KNOBLOCH, J. & ARNOLD, H.H.. Genomic DNA differences between pathogenic and non pathogenic *Entamoeba histolytica*: *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, v. 86, p.5118-5122. 1989

TANYUKSEL, M. & PETRI, W. A. JR. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* ,v. 16, .n.4, p. 713–729. 2003

TANYUSKEL, M.; YILMAZ, H.; ULAKANLIGIL, M.; ARZ, E.; CICEK, M.; KORU, O.; PETRI, W.A. Jr. Comparison of two methods (microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay) for diagnosis of amebiasis. *Exp. Parasitol.*, v. 110, n. 3, p.322-326. 2005

THRUSFIELD, M.; ORTEGA, C.; DE BLAS, I.; NOORDHUIZEN, J.P.; FRANKENA, K. Win episcopo 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *The veterinary record* n.18, v.148, p.567-72. 2001

TROLL, H.; MARTI, H.; WEISS, N. Simple differential detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fresh stool specimens by sodium acetate-acetic acid-formalin concentration and PCR. *J.Clin. Microbiol*, v.35, n. 7. p. 1701-1705. 1997

VERWEIJ, J. J.; BLANGÉ, R.A.; TEMPLETON, K.; SCHINKEL, J.; BRIENEN, E.A.T.; VAN ROOYEN, M.A.A.; VAN LIESHOUT, L. & POLDERMAN A.M. Simultaneous Detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time pcr. *J.Clin. Microbiol* , n.3, v.42, p.1220-1223. 2004

VERWEIJ, J. J.; BLOTKAMP, J.; BRIENEN, E. A.; AGUIRRE A. & POLDERMAN, A. M. 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.*, v.19, p. 358-361. 2000

VERWEIJ, J. J.; LAEIJENDECKER, D.; BRIENEN, E. A. T. LIESHOUT, L. V.; POLDERMAN, A. M. Detection and identification of *Entamoeba* species in stool samples by a reverse line hybridization assay. *J.Clin. Microbiol*, v. 41, n. 11, p. 5041-5045. 2003

VERWEIJ, J. J.; POLDERMAN, A M.; CLARK, C. G. Genetic variation among human isolates of uninucleated cyst-producing *Entamoeba* species. *J.Clin. Microbiol*, v. 39, n. 4, p. 1644-1646. 2001

VERWEIJ, J. J.; VERMEER, J.; BRIENEN, E. A. T; BLOTKAMP, C.; LAEIJENDECKER, D.; LIESHOUT, L. V.; POLDERMAN, A. M. *Entamoeba histolytica* infections in captive primates. *Parasitol. Res.*, v.90, p.100-103. 2003

WALDERICH A.; MÜLLER L.; BRACHA R.; KNOBLOCH J. & BURCHARD D. A new method for isolation and differentiation of native *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* cysts from fecal samples. *Parasitol. Res*, v. 83,p. 719-721. 1997

WALKER, E L. A comparative study of amoeba in the manila water supply in the intestinal tract of healthy persons and amoebic dysentery. *Phillip. J. Sci.* v.6, p. 259-279. 1911

WALSH, J. A. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis estimation of global magnitude of morbity and mortality. *Rev. Infect. Dis.*, v. 8, p. 228-238. 1986

WILSON I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.63, n. 10, p.3741-3751. 1997

WORLD HEALTH ORGANIZATION meeting. Amoebiasis and its control. *Bull Word Health Organ* , v. 63, p. 417-426. 1985

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Amebiasis. *Wkly Epidemiol. Rec.*, v.72, p.97-100. 1997

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*, v.37, n.9, p.3034-3036. 1999

ANEXOS

Anexo AMIF (modificado)

Formalina P.A. -----	500ml
Água destilada -----	4.500ml
Glicerina -----	50 ml
Mercúrio-cromo -----	1.0 g

Anexo BPavlova modificado (meio para cultivo polixênico de *E.histolytica* e *E.dispar*)

Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O -----	2.44g
KH ₂ PO ₄ -----	0,42g
NaCl -----	7.27g
Extrato de Levedo -----	1.46g
Água destilada q.s.p -----	1000ml

Acertar o pH 7.2 a 7.4 com NaOH 10M

Acrescentar 5% de soro de boi (inativado a 56% durante 30 min), Penicilina G

Potássica – 1000 U/ml, Estreptomicina – 500 µg/ml

Filtrar em Seitz

Acrescentar amido de arroz estéril – 1,0 mg/ml (distribuir 1g de amido nos tubos de ensaio, deixar espalhado pelo tubo e esterilizar em estufa a 100°C por 4 vezes. No momento de uso dissolver este amido com 10 ml de meio estéril e usar 1 ml dessa solução para cada litro de Pavlova a ser preparado).

Distribuir em tubos de rosca – 10ml/tubo

Anexo C

Meio TYI – S –33 (meio para cultivo axênico e monoxênico de *E.histolytica*)

Tripticase -----	20.g
Extrato de levedo-----	10g
Glicose -----	10g
NaCl -----	2g
K ₂ HPO ₄ -----	1g
KH ₂ PO ₄ -----	0.6g
L cisteina -----	1g
Ácido ascórbico -----	0.2g
Citrato de ferro amoniacal -----	0.0228g

Acertar o pH para 7.0 com NaOH 10M

Esterilizar por 15 minutos a 120° C

Deixar esfriar e acrescentar: 30ml da mistura de vitaminas TWEEN 80, 100ml de soro bovino (inativado 30 minutos a 56° C), Penicilina G Potássica – 1000 U/ml, Estreptomicina – 500 µg/ml

Filtrar em Seitz e distribuir em tubos de rosca (15ml/tubo)

Anexo D

Formalina tamponada (pH= 7,2)

Formaldeído PA -----	100 ml
H ₂ O destilada -----	900 ml
Fosfato de sódio monobásico - NaHPO ₄ .H ₂ O -----	4,25 g
Fosfato de sódio dibásico anidro - Na ₂ HPO ₄ -----	6,5 g

Anexo E

TAE 50X

Tris base aminometano -----	242. g
Ácido acético -----	57,1 ml
EDTA 0.5 M pH 8,0-----	100 ml
Água destilada q.s.p. -----	1000 ml