

Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - ICBS
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde - PPGCS

Rafael Vital dos Santos

**Discriminação da infecção causada pela *Entamoeba histolytica*
(Schaudinn, 1903) e *Entamoeba dispar* (Brumpt, 1925) em escolares
da rede pública da cidade de Maceió-AL.**

Maceió – Alagoas
2010

Rafael Vital dos Santos

Discriminação da infecção causada pela *Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903) e *Entamoeba dispar* (Brumpt, 1925) em escolares da rede pública da cidade de Maceió-AL.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Maria Mauricio da Rocha

Maceió – Alagoas

2010

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- S237d Santos, Rafael Vital dos.
Discriminação da infecção causada pela *Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903) e a *Entamoeba dispar* (Brumpt, 1925) em escolares da rede pública da cidade de Maceió-AL / Rafael Vital dos Santos, 2010.
101 f. : graf. e tabs.
- Orientadora: Eliane Maria Maurício da Rocha.
Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2010.
- Bibliografia: f. [79]-93.
Apêndices: f. [94]-111.
1. Epidemiologia – Maceió (AL). 2. Amebíase. 3. *Entamoeba histolytica*.
4. *Entamoeba dispar*. I. Título.

CDU: 616.993.12



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Defesa da Dissertação de Mestrado do aluno Rafael Vital dos Santos, intitulado: "Discriminação da infecção causada pela *Entamoeba Histolytica* (Schaudinn, 1903) e *Entamoeba dispar* (Brumpt, 1925) em escolares da rede pública da cidade de Maceió -AL", orientado pelo Profa. Dra. Eliana Maria Mauricio da Rocha, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 25 de fevereiro de 2010.

Os membros da Banca Examinadora, consideraram o candidato APROVADO

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Eliana Maria Mauricio da Rocha - Orientador (UFSJ)

Prof. Dr. Eduardo Sérgio da Silva - titular (UFSJ)

Prof. Dr. Cláudio Torres de Miranda - titular (FAMED/UFAL)

Prof. Dr. Luiz Antônio Ferreira da Silva – titular (ICBS/UFAL)

DEDICO

A minha família.

5

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Sebastiana Vital dos Santos (Dona Nega), que me ensinou a ter a garra, força, educação e senso de respeito nos momentos mais difíceis da minha vida e por ensinar os valores necessários para formação do caráter do meu filho Luiz Guilherme Vital de Oliveira Correia.

A minha esposa Auridete Maria de Oliveira Correia, que sempre me apoiou, incentivou e faz com que os meus sonhos se realizem sempre que possível, e até quando impossível.

Aos Professores Dra. Eliana Maria Mauricio da Rocha e Dr. Gilberto Fontes pela amizade, ensinamentos, e experiência transmitidas ao longo dos seis anos dos quais pertenci ao Laboratório de Filariose.

A Dra. Iasmin A. Cavalcanti Duarte Professora de Puericultura da Faculdade de medicina pelos conselhos sábios e por toda a sua atenção e empenho nos momentos que mais precisei.

Aos meus amigos e companheiros de Laboratório que trabalharam ativamente ao meu lado para a conquista deste objetivo: Wendell de Almeida, Lívia Santiago Teixeira, José Alfredo dos Santos Júnior, Fagner Pimentel Cardoso de Oliveira, Verônica de Medeiros Alves, Ana Rúbia Batista Ribeiro, Erlan Pereira de Azevedo, Juliana Vasconcelos Lyra da Silva, Paula de Oliveira Queiroz, Anderson Brandão Leite, Ana Rachel Vasconcelos, Ana Dalva Sampaio Lima, Gabriela Lisboa, Larissa A. Ribeiro Oliveira, Eveline Macedo, Jonathan Emmanuel Leite Gonçalves, e a todos os outros estagiários que passaram pelo laboratório de Filariose que diretamente e indiretamente contribuíram para esta conquista.

Ao Professor Luiz Antonio Ferreira da Silva e ao amigo Ms. Benisio Ferreira da Silva Filho, ambos do laboratório DNA Forense, pelo apoio e parceria no desenvolvimento da PCR.

A todos os estudantes, pais, diretores e profissionais da educação envolvidos no presente trabalho pela boa vontade e educação em nos receberem permitindo desta forma a realização do presente estudo.

A Universidade Federal de Alagoas e ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde pela criação inovadora do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde ao qual tive o prazer e satisfação em participar.

A todos os professores do mestrado, Iracilda Lima, Claudio Miranda, Eliana M. M. da Rocha, Emiliano Barreto, Luiz Antônio, Gilberto Fontes, Ricardo Nogueira, Silvana Ayres, Salete Smaniotto, Vânia Andrade, e a todos os outros docentes que fazem parte do Mestrado em Ciências da Saúde e que contribuíram para minha formação intelectual.

Aos amigos Marly Josefina Santos da Silva, Ana Celina Santos da Silva, Maria Natalia Santos da Silva e Isaac Nascimento por sempre participarem do meu crescimento, contribuindo com sábios ensinamentos transformando meus problemas em oportunidades.

Aos colegas de turma de pós-graduação: Guacyra Machado Lisboa, Gustavo Reis Branco de Souza, Krystianelly Patrícia Pedrosa Santa Rita, Diogo José Costa da Silva, Anansa Bezerra de Aquino, Thays de Lima Matos Freire Dias, Maria Sonia Correia Alves e Danielle Correia Gama.

Ao apoio das instituições de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas – FAPEAL, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

RESUMO

A amebíase é uma infecção severa que tem como agente etiológico o protozoário *Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903). Esta espécie é morfológicamente indistinguível da *Entamoeba dispar* (Brumpt, 1925), considerada apatogênica, incapaz de provocar a forma invasiva da doença. A diferenciação entre as duas espécies através de técnicas de diagnóstico imunológico e de biologia molecular, é fundamental para determinação da situação epidemiológica da amebíase, estabelecimento da conduta terapêutica adequada, e conseqüentemente prevenção da doença invasiva. O objetivo do presente estudo foi discriminar a infecção causada pela *E. histolytica* e *E. dispar* na população de escolares da cidade de Maceió, Alagoas. Para tal, realizou-se um estudo de corte transversal, com 1.003 estudantes da rede pública estadual de ensino da cidade. Foi realizado exame de fezes, pelo método de sedimentação espontânea, para avaliação da frequência das parasitoses intestinais, e para a triagem dos escolares infectados pelo complexo *E. histolytica/E. dispar*. Os exames positivos para cistos de *Entamoeba* foram posteriormente submetidos à pesquisa de antígeno pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) e reação em cadeia da polimerase (PCR), para o diagnóstico específico da infecção. A frequência de enteroparasitos entre os examinados foi elevada, sendo identificados 54,8% (550/1.003) escolares infectados por pelo menos uma espécie de helminto ou protozoário. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi padronizada utilizando para extração do DNA das fezes o *Kit Stool PSP* (Invitek®). Os iniciadores selecionados através da análise *in silico* pelo bom desempenho virtual para amplificação da *E. histolytica* e da *E. dispar*, foram p11plus/p12plus e p13plus/p14plus, respectivamente. A prevalência da amebíase nos escolares diagnosticada pelo ELISA foi de 3,0% (30/1.003) e na PCR 2,8% (28/1.003), não existindo diferença significativa entre as percentagens de infectados ($p > 0,05$). A prevalência geral da *E. dispar* nos escolares foi de 5,0% (50/1.003). Ambas as técnicas (ELISA e PCR) se mostraram adequadas para diagnóstico diferencial da *E. histolytica* e *E. dispar*. No entanto, o ELISA apresenta a vantagem ser de rápida e simples execução. Os resultados apresentados indicam a necessidade da utilização de técnicas de diagnóstico específico para detecção de casos amebíase na população.

Palavra-chave: Amebíase, *E. histolytica*, *E. dispar*

ABSTRACT

Amebiasis is a severe infection caused by the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903). This species is morphologically indistinguishable from *Entamoeba dispar* (Brumpt, 1925), considered to be non-pathogenic and unable to cause invasive illness. The differentiation between these two species by immunological and molecular biology techniques is important to determine the epidemiological situation, therapeutic intervention, and profilaxis of invasive amebiasis. The aim of this study was to discriminate infection caused by *E. histolytica* and *E. dispar* in schoolchildren population in the city of Maceió, Alagoas. A cross-sectional study was carried out among 1,003 students in state public schools. Stool examination by sedimentation technique was conducted in order to evaluate frequency of enteroparasites, and for screening of students infected with *E. histolytica*/*E. dispar* complex. Positive exams for *Entamoeba* cysts were further submitted to antigen detection assay by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and polymerase chain reaction (PCR), for specific diagnosis of the infection. Frequency of intestinal parasites among the examined population was high, being detected 54.8% (550/1,003) students harbouring at least one species of helminth or protozoan parasites. Most of the students families (57.5%), belonged to class D economic level according to the Brazilian Economic Classification Criteria. Of the total assessed 83.1% had an income \leq 1 minimum wage and lived in households with 2-5 residents. Polymerase chain reaction (PCR) was standardized extracting DNA from the stool using Stool Kit PSP (Invitek ®). The primers selected by *in silico* analysis based on virtual performance for amplification of *E. histolytica* and *E. dispar* were p11plus/p12plus and p13plus/p14plus, respectively. The prevalence of amebiasis among schoolchildren diagnosed by ELISA was 3.0% (30/1,003) and by PCR 2.8% (28/1,003), but the difference was not statistically significant ($p > 0.05$). The overall prevalence of *E. dispar* in schoolchildren was 5.0% (50/1,003). Both techniques (ELISA and PCR) were appropriate for differential diagnosis of *E. histolytica* and *E. dispar*. However, ELISA has advantages such as its rapid and easy execution. The results indicates the importance of specific diagnostic techniques for amoebiasis detection in the population.

Key-words: Amoebiasis, *E. histolytica*, *E. dispar*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Formas evolutivas da <i>Entamoeba histolytica</i>	22
Figura 2	Ciclo de vida da <i>Entamoeba histolytica</i>	23
Figura 3	Lesões causadas pela <i>Entamoeba histolytica</i>	24
Figura 4	Distribuição dos escolares por Coordenadoria de Ensino (CES), estratificados por média de alunos por escola (645 escolares), e definição do número de escolares a serem avaliados em cada CES.....	36
Figura 5	Fluxograma das atividades desenvolvidas no campo.....	37
Figura 6	Diagrama do método de Lutz e armazenamento das amostras de fezes.....	40
Figura 7	Diagrama da análise virtual dos iniciadores descritos na literatura para a detecção da <i>E. histolytica</i> e <i>E. dispar</i>	42
Figura 8	Fórmulas utilizadas para mensuração da qualidade das técnicas no diagnóstico da amebíase.....	46
Figura 9	Mapa da Cidade de Maceió: Distribuição dos escolares da rede pública de ensino, avaliados por bairro.....	48
Figura 10	Frequência de monoparasitismo e poliparasitismo de acordo com a faixa etária, em escolares da rede da rede pública da cidade de Maceió-AL	50
Figura 11	Gel de Agarose 3%. Poço M: Marcador de peso molecular de 20pb (Invitrogen®); Poços 1 e 2: amplicom da <i>E. histolytica</i> (100pb) com 10pm e 20pm, respectivamente; Poços 3 e 4: amplicom da <i>E. dispar</i> (101pb) 10pm e 20pm, respectivamente; Poço 05: Controle negativo (unificado) para ambas as espécies.....	65
Figura 12	Gel de Agarose 3%. Poço M: Marcador de peso molecular ϕ X 174 RF (Promega®); Poços 1 e 2: Controle positivo <i>E. histolytica</i> (100pb) e <i>E. dispar</i> (101pb), respectivamente; Poços 3 a 7 amostras de fezes positivas para diferentes espécies de parasitos; Poço 3: <i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Trichures trichiura</i> ; Poço 4: Ancylostomatidae, <i>Strongyloides stercoralis</i> ; Poço 5: <i>Enterobius vermicularis</i> , <i>Schistosoma mansoni</i> Poço 6: <i>Hymenolepis nana</i> , <i>Giardia lamblia</i> ; Poço 7: <i>Entamoeba coli</i> e <i>Endolimax</i> ; Poço 8: Controle negativo (unificado) para ambas as espécies.....	65

Figura 13	Gel de Agarose 3%. Poço M: Marcador de peso molecular de 20pb (Invitrogen®); Poços 1 e 3: Controle positivo da <i>E. histolytica</i> (100pb) e <i>E. dispar</i> (101pb), respectivamente; Poço 2: amostra com DNA da <i>E. dispar</i> amplificado com iniciadores para <i>E. histolytica</i> ; Poço 4: amostra com DNA da <i>E. histolytica</i> amplificado com iniciadores para <i>E. dispar</i>	66
Figura 14	Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígeno de <i>Entamoeba histolytica</i> em amostras fecais.....	70
Figura 15	Mapa da cidade de Maceió-AL: Caracterização geográfica dos casos de amebíase nos escolares da rede pública de ensino.....	70
Figura 16	Determinação do valor preditivo positivo da microscopia ótica em relação a métodos específicos como: ELISA e PCR.....	72
Figura 17	Avaliação da sensibilidade, sensibilidade, valor preditivo positivo e negativo da PCR versus ELISA.....	73

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1	Principais fatos históricos relacionados à amebíase.....	20
Quadro 2	Aspectos gerais de diferenciação entre <i>Entamoeba histolytica</i> e <i>E. dispar</i>	25
Quadro 3	Análise por bioinformática dos iniciadores utilizados para amplificação de <i>Entamoeba</i> , descritos na literatura no período de 1991-2008, com descrição da técnica, região alvo, seqüência dos iniciadores, quantidade de citosina e guanina (CG), amplicon e dados do GenBank.	57
Tabela 1	Distribuição dos escolares da rede pública da cidade de Maceió-AL segundo a faixa etária e o sexo.....	48
Tabela 2	Distribuição dos resultados dos exames parasitológico de fezes de acordo com a faixa etária nos escolares da rede pública.....	50
Tabela 3	Frequência de parasitos nos escolares da rede pública de ensino da cidade de Maceió-AL.....	51
Tabela 4	Distribuição dos escolares da rede pública de ensino da cidade de Maceió-AL por classe econômica.	52
Tabela 5	Renda familiar, Moradia e número de residentes no domicílio da família dos escolares da rede pública de ensino da cidade de Maceió-AL.....	52
Tabela 6	Condições de moradia dos escolares da rede pública de ensino da cidade de Maceió-AL.....	53
Tabela 7	Prevalência da <i>E. histolytica</i> e <i>E. dispar</i> através da PCR nos escolares da rede pública da cidade de Maceió-AL	67
Tabela 8	Prevalência da amebíase de acordo com faixa etária nos escolares da rede pública da cidade de Maceió-AL	68
Tabela 9	Comparação do resultado da Reação em Cadeia da Polimerase com Ensaio Imunoenzimático em 64 amostras de fezes positivas na microscopia em escolares da rede pública de ensino da cidade de Maceió-AL	73

LISTA DE ABREVIATURAS

BLASTn	Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide
BSA	Soro Albumina Bovina
DNTP	Desoxiribonucleotídeo trifosfato
CES	Coordenadoria de Ensino
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
q.s.p.	quantidade suficiente para
rpm	rotações por minuto
SEEE	Secretaria do Estado de Educação e do Esporte
SEQREF	Sequência de Referência
SMS	Secretaria Municipal de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1. ASPECTOS HISTÓRICOS.....	20
2.2. O PARASITO.....	21
2.2.1. Taxonomia.....	21
2.2.2. Formas Evolutivas.....	21
2.2.2.1. Trofozoíto.....	21
2.2.2.2. Cisto.....	21
2.2.3. Ciclo Biológico.....	22
2.2.3.1. Ciclo Não Patogênico	22
2.2.3.2. Ciclo Patogênico.....	23
2.2.4. Patologia	24
2.3. DIFERENCIAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES <i>E. histolytica</i> E <i>E. dispar</i>.....	25
2.4. DIAGNÓSTICO	25
2.4.1. Clínico.....	25
2.4.2. Laboratorial.....	26
2.4.2.1. Pesquisa do Complexo <i>E. histolytica/dispar</i> - Microscopia ótica	26
2.4.2.2. Pesquisa de Antígeno – Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	26
2.4.2.3. Pesquisa de DNA – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	27
2.4.2.4. Cultura de material fecal	28
2.5. EPIDEMIOLOGIA DA AMEBÍASE.....	29
2.5.1. Situação epidemiológica mundial.....	29
2.5.2. Distribuição geográfica no Brasil.....	30
2.6. PREVENÇÃO E CONTROLE.....	30
3. OBJETIVOS.....	31

3.1. OBJETIVO GERAL	32
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. DESCRIÇÃO DA ÁREA	34
4.2. DESENHO DO ESTUDO	34
4.2.1. Definição e cálculo do tamanho da amostra.....	34
4.3. CRITÉRIO DE INCLUSÃO	35
4.4. SISTEMATIZAÇÃO NO CAMPO	37
4.4.1. Aplicação do questionário.....	38
4.4.2. Dados socioeconômicos - Critério Brasil	38
4.5. ASPECTOS ÉTICOS	38
4.5.1. Tratamento antiparasitário	38
4.6. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO	39
4.6.1. Exame Parasitológico de Fezes	39
4.6.1.1. Armazenamento das Fezes.....	39
4.7. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA AMEBÍASE	40
4.7.1. Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.....	40
4.7.1.2. Controle Positivo.....	40
4.7.1.3. Seleção e análise virtual <i>in silico</i> dos iniciadores da literatura para detecção da <i>E. histolytica</i>	41
4.7.1.4. Extração do DNA.....	42
4.7.1.5. Amplificação.....	44
4.7.1.6. Detecção do produto amplificado.....	45
4.7.2. Ensaio Imunoenzimático – ELISA.....	45
4.7.2.1. Leitura e Interpretação dos resultados.....	45
4.8. DETERMINAÇÃO DA ACURÁCIA DAS TÉCNICAS	46
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	46

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	48
5.2. PARASITOSES INTESTINAIS	49
5.2.1. Frequência das parasitoses intestinais.....	49
5.3. CARACTERIZAÇÃO SOCIOECONOMICA	51
5.3.1. Condições de moradia das famílias dos escolares.....	52
5.4. MICROSCOPIA ÓPTICA PARA DIAGNÓSTICO DA AMEBÍASE	55
5.5. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR	55
5.5.1. Seleção dos iniciadores: análise <i>in silico</i>	55
5.5.2. Padronização da PCR.....	64
5.5.3. Prevalência da <i>Entamoeba histolytica</i> e <i>Entamoeba dispar</i> pela PCR.....	66
5.6. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO - ELISA	68
5.6.1. Prevalência da <i>Entamoeba histolytica</i> pelo ELISA.....	68
5.7. COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS PARA O DIAGNÓSTICO DA AMEBÍASE	71
5.7.1. Microscopia ótica versus ELISA e PCR	72
5.7.2. ELISA versus PCR	72
6.0. CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICE	94
ANEXO	99

1. INTRODUÇÃO

A amebíase é uma infecção severa cujo agente etiológico é o protozoário *Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903), sendo considerada importante causa de morbi-mortalidade para saúde pública no mundo (OMS/OPAS/UNESCO, 1997).

No grupo das parasitoses causadas por protozoários a amebíase constitui a segunda maior causa de mortalidade, superada apenas pela malária. Estima-se que 500 milhões de pessoas são infectadas pela *E. histolytica* anualmente. Destas 40 milhões desenvolvem a forma sintomática da doença, resultando em cerca de 100.000 óbitos por ano devido a complicações secundárias (WHO, 1997; OMS/OPAS/UNESCO, 1997).

As maiores prevalências estão em países de regiões tropicais das Américas do Sul e Central - em especial México e Colômbia – da África, da Oceania e da Ásia, onde a Índia e Bangladesh ocupam lugar de destaque. Estes locais têm em comum baixo nível socioeconômico e condições sanitárias inadequadas, que aliadas ao clima tropical favorecem a sobrevivência, proliferação e transmissão do parasito (CONDE-BONFIL & MORA-ZERPA, 1992; BRAGA *et al.*, 2001; STAUFFER *et al.*, 2006, XIMENES *et al.*, 2009).

A observação de dados epidemiológicos com relação à forma sintomática e assintomática da parasitose fez Brumpt, em 1925, sugerir a existência de outra espécie de *Entamoeba* - *E. dispar* (Brumpt, 1925) - morfologicamente indistinguível da *E. histolytica*. Desta forma, a *E. dispar* se comportaria como um comensal do intestino humano, sendo responsável pelos casos assintomáticos, e a *E. histolytica* representaria a espécie causadora da forma patogênica da infecção (DIAMOND & CLARK, 1993).

A distinção das duas espécies foi demonstrada por estudos imunológicos, genéticos e bioquímicos, confirmando a hipótese de Brumpt, sendo referendada pela OMS em 1997. Até então os dados epidemiológicos relativos à amebíase eram obtidos através do diagnóstico microscópico pela observação das formas de cistos e trofozoítos do parasito, que não permite a diferenciação da *E. histolytica* de outros amebídeos comensais do intestino humano (DIAMOND & CLARK 1993; TANYUKSEL & PETRI, 2003; OMS/OPAS/UNESCO, 1997).

Atualmente, a presença da *E. histolytica* deve ser confirmada por técnicas de diagnóstico específicas como imunodiagnóstico pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígenos, ou técnicas de biologia molecular como a

reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do DNA, uma vez que o tratamento é preconizado somente nos casos confirmados de amebíase (WHO, 1997).

No Brasil, a situação epidemiológica da amebíase permanece indefinida em várias regiões, mas os poucos dados existentes demonstram grande variação na prevalência da infecção a depender da localidade. Em Recife-PE nenhum caso foi encontrado, contrastando dados encontrados na região metropolitana Belém-PA, cuja prevalência chega a 29,35%, caracterizando a amebíase como problema de saúde pública (PINHEIRO, 2004; SILVA, 2005). Em Maceió-AL, estudos indicam uma prevalência da parasitose igual a 1% na população de escolares (DUARTE, 2006).

A discriminação da infecção causada pela *E. histolytica* e *E. dispar* em escolares da rede pública da cidade de Maceió-AL se justifica pela necessidade de informar aos profissionais da saúde real situação da endemia na cidade, a fim de que tenham segurança na indicação do tratamento, particularmente em crianças na faixa etária escolar que constituem grupo de risco para amebíase (HAQUE *et al.*, 2003).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Aspectos históricos

No quadro 1 estão relacionados os principais marcos históricos e científicos referentes a amebíase.

Quadro 1 – Principais fatos históricos e científicos relacionados à amebíase.

Período	Fatos histórico e científicos	Referência
460-377 a.C.	Hipócrates na Grécia antiga pode ter sido o primeiro a relatar a amebíase na história quando descreveu um caso de febre e disenteria causado por uma “doença mortal”.	TANYUKSEL & PETRI, 2003.
1875	Fedor Losch em São Petersburgo na Rússia observou, em um camponês, protozoários que classificou como <i>Amoeba coli</i> , e caracterizou a morfologia dos trofozoítos.	CLARK, 1998.
1891	Councilman & Lafleur detalharam a clínica da doença e classificaram o parasito de <i>Amoeba dysenteriae</i> .	LUCAS & UPCROFT, 2001.
1903	Schaudinn afirmou a existência de duas espécies, sendo a patogênica a <i>E. histolytica</i> , devido a sua capacidade de lisar o tecido, e a não patogênica <i>Entamoeba coli</i> .	HUSTON & PETRI, 1999.
1925	Brumpt propõe, com base em aspectos clínicos-epidemiológicos, a existência de uma espécie patogênica - <i>E. histolytica</i> e outra comensal do intestino humano não patogênica - <i>E. dispar</i> .	CLARK, 1998.
1961	Diamond conseguiu, pela primeira vez, isolar o parasito em cultura axênica.	DIAMOND, 1961
1978	Sargeant e colaboradores (1978) confirmaram a hipótese de Brumpt baseados no perfil eletroforético de isoenzimas (zimodemas) da <i>E. histolytica</i> e <i>E. dispar</i> .	GONZALEZ-RUIZ <i>et al.</i> , 1994.
1989	Tannich e colaboradores (1989) mostraram diferenças no genoma das espécies patogênica e não patogênica.	TANNICH <i>et al.</i> , 1989.
1990	Petri e colaboradores (1990) obtiveram anticorpos monoclonais para diferentes epitopos da lectina (subunidade de 170 KDa) da membrana da <i>E. histolytica</i> .	PETRI <i>et al.</i> , 1990.
1993	Diamond e Clark reafirmaram a hipótese de Brumpt baseados em evidências bioquímicas, imunológicas e genômicas.	DIAMOND & CLARK, 1993.
1997	A Organização Mundial de Saúde reconhece a existência de duas espécies morfologicamente idênticas à microscopia óptica: <i>E. histolytica</i> e <i>E. dispar</i> .	OMS/OPAS/ UNESCO, 1997.
2005	Loftus e colaboradores (2005) sequenciaram parte do genoma da <i>E. histolytica</i> possibilitando estudos sobre os fatores de virulência, metabolismo, adaptações ao meio e evolução do parasito.	LOFTUS <i>et al.</i> , 2005.

2.2. O PARASITO

2.2.1 Taxonomia

A *E. histolytica*, agente etiológico da amebíase, pertence ao Filo Sarcomastigophora, Subfilo Sarcodina, Superclasse Rhizopoda, Classe Lobosea, Ordem Amoebida, Subordem Tubulina, Família Endomoebidae, Gênero *Entamoeba*, Espécie *E. histolytica* (Schaudinn, 1903) (LEVINE *et al.*, 1980).

2.2.2. Formas evolutivas

2.2.2.1. Trofozoítos

Os trofozoítos são formas vegetativas, pleomórficas, com tamanho variando entre 10µm e 40µm de diâmetro podendo alcançar até 60µm na forma invasiva. O citoplasma apresenta duas regiões: uma hialina (ectoplasma) e outra granulosa (endoplasma). O endoplasma apresenta citoesqueleto e sistema de lisossomo primário e secundário, além de vacúolos digestivos que na forma patogênica podem conter hemácias (LOHIA, 2003).

O habitat dos trofozoítos é o intestino grosso (forma não invasiva) ou o tecido do hospedeiro (forma invasiva). A respiração é anaeróbica ou aeróbica facultativa em meio à baixa tensão de oxigênio. Os movimentos, pela emissão e pseudópodes, são rápidos e unidirecionais (Figura 1A e B) (STANLEY, 2003).

2.2.2.2. Cistos

Os cistos são formas redondas ou ligeiramente ovais com diâmetro entre 10µm a 20µm. Apresentam de 1 a 4 núcleos, a depender do grau de maturidade, com cromatina periférica, corpos cromatóides em forma de bastões, e cariossoma central. Apresentam uma membrana de quitina que confere resistência ao suco gástrico estomacal e a fatores ambientais externos como: acidificação, cloração e dissecação (Figura 1C) (BERNAL-REDONDO, 2001).

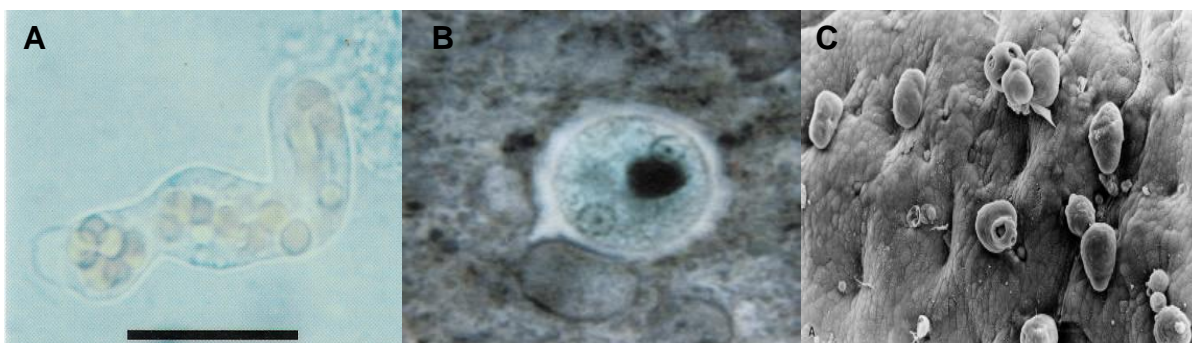


Figura 1 – Formas evolutivas da *Entamoeba histolytica*. **A**-Trofozoíto de *E. histolytica* com hemácias em seu interior (OMS, 1994); **B**-Cisto em amostra de fezes, com dois núcleos e cariossoma central (STANLEY, 2003); **C**- Trofozoítos aderidos ao epitélio intestinal de suíno pela lectina na região interglandular (MARTINEZ-PALOMO & ESPINOSA-CANTELLANO, 1998).

2.2.3. Ciclo biológico

2.2.3.1. Ciclo não patogênico

O ciclo biológico da *E. histolytica* é monoxênico (Figura 2). A infecção ocorre pela ingestão de cistos maduros junto com água ou alimentos contaminados com fezes ou por contato sexual oral-anal. O cisto tetranucleado atravessa íntegro o estômago. No final do intestino delgado ocorre o desencistamento, e após seguidas fissões binárias há formação de oito trofozoítos com apenas um núcleo (metacistos). Os trofozoítos metacísticos migram para a porção final do intestino delgado (colón), onde fagocitam enterobactérias e englobam partículas nutritivas do meio como um comensal (HUSTON & PETRI, 1999; TANYUKSEL & PETRI, 2003).

Devido a fatores ainda não completamente elucidados, os trofozoítos se desprendem da parede do intestino, sofrem desidratação e se transformam em pré-cistos, que amadurecem com a formação da membrana cística resultando nos cistos. Ao chegarem ao meio ambiente com as fezes formadas, resistem às condições do meio externo e podem infectar outros indivíduos (Figura 2).

Dados epidemiológicos demonstram que aproximadamente 90% das infecções por *E. histolytica* são assintomáticas, existindo apenas a formação de cistos e conseqüentemente a proliferação do parasito (WALSH, 1986).

2.2.3.2. Ciclo patogênico

Ocasionalmente, a depender de circunstâncias ainda não totalmente esclarecidas entre o parasito e o hospedeiro, os trofozoítos se aderem a mucinas na superfície epitelial do intestino grosso, destroem as microvilosidades, e penetram no epitélio através das glândulas de Lieberkuhn. No interior de ulcerações (forma invasiva) na submucosa os trofozoítos multiplicam-se por bipartição, englobam hemácias (eritrofagocitose) e/ou fragmentos celulares, e não produzem a forma cística (FONTE, 2000).

A aderência do parasito efetua-se pela ação de uma lectina (proteína de membrana) que apresenta afinidade específica por resíduos de galactose e N-acetilgalactosamina da superfície epitelial (ESPINOSA-CANTELLANO & MARTINEZ-PALOMO, 2000).

Em alguns casos, os trofozoítos podem migrar pela circulação porta para regiões como: fígado, pulmão, cérebro, rim e pele formando abscessos resultando na amebíase extra-intestinal (NUNEZ *et al.*, 2001; SALLES *et al.*, 2002).

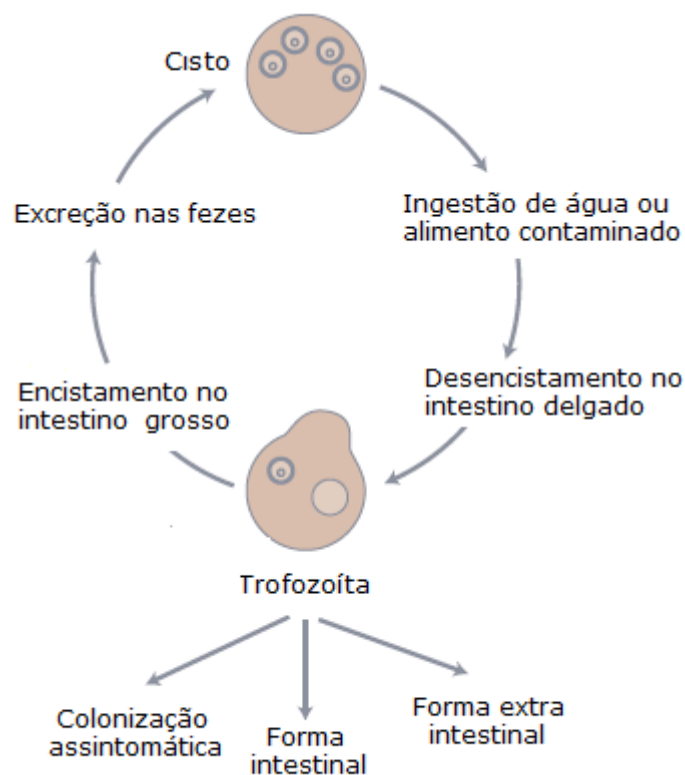


Figura 2 - Ciclo evolutivo da *Entamoeba histolytica* com modificações do esquema original de HUSTON *et al.*, 1999.

2.2.4. Patologia

As manifestações clínicas, quando presentes, são bastante diversificadas e podem ser semelhantes a outras infecções intestinais. Dentre os indivíduos sintomáticos, a colite não-disentérica é a manifestação mais frequente (90%). É caracterizada por evacuações diarréicas ou não, contendo muco ou sangue, raramente com manifestação febril, podendo ocorrer alternância entre períodos silenciosos e sintomáticos (LUCAS & UPCROFT, 2001).

A forma disentérica é caracterizada por cólicas intestinais, diarréia muco-sanguinolenta, acompanhada de tenesmo e frio intenso. Pode evoluir para um quadro mais severo de disenteria amebiana aguda consolidada, com diarréia muco-sanguinolenta, prostração, desidratação grave e perfurações do intestino por ulcerações e necrose (Figura 3A) (MARTINEZ-PALOMO & ESPINOSA-CANTELLANO, 1998).

A amebíase extra intestinal é considerada rara, mas quando existente atinge principalmente o fígado formando abscessos hepáticos caracterizados por dor, febre e hepatomegalia (Figura 3B). O abscesso hepático começa pela invasão do epitélio intestinal e posterior migração do trofozoíto via porta (SALLES *et al.*, 2003).

Os abscessos pulmonares e cerebrais são extremamente raros, ocorrendo na maioria das vezes com a ruptura dos abscessos hepáticos e posterior proliferação no organismo (ANDRADE & ANDRADE, 1996).

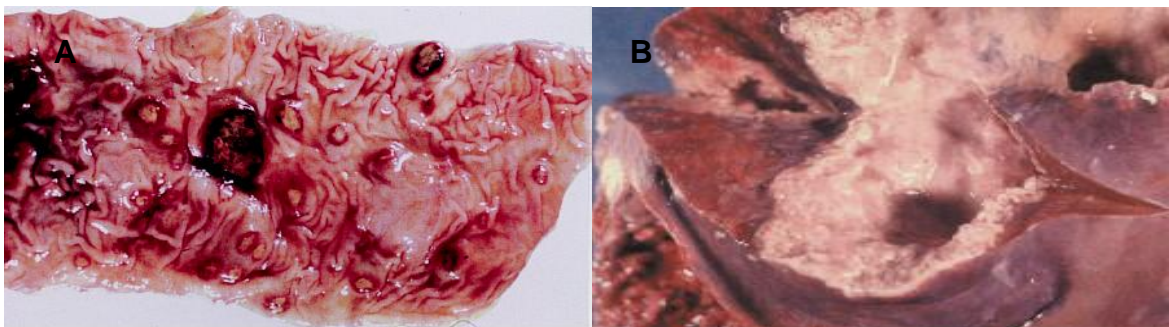


Figura 3 – Lesões causadas pela *Entamoeba histolytica*. **A** - Mucosa intestinal com lesões nodulares arredondadas - áreas com ligeira elevação da mucosa com centros necróticos irregulares circundado por tecido edematoso (MARTINEZ-PALOMO & ESPINOSA-CANTELLANO, 1998); **B** - Abscesso hepático - seção mostrando material necrosado dentro do abscesso e parênquima do fígado adjacente normal (STANLEY, 2003).

2.3. DIFERENCIAÇÃO ENTRE AS ESPÉCIES *E. histolytica* E *E. dispar*

No quadro 2 estão relacionadas características que permitem a diferenciação entre as espécies *E. histolytica* e *E. dispar*.

Quadro 2 - Aspectos gerais de diferenciação entre *Entamoeba histolytica* e *E. dispar*

Característica	<i>E. histolytica</i>	<i>E. dispar</i>	Referência
Padrão de isoenzimas da via glicolítica	Padrão distinto (especialmente da hexoquinase)		SARGEAUNT, 1978
Resposta imune do hospedeiro	Indução de resposta imune humoral	Ausente	ABD-ALLA <i>et al.</i> , 2000
Quadro clínico da infecção	Assintomática ou sintomática em vários graus de virulência	Sempre assintomática	WHO, 1997
Isolamento e cultivo	Manutenção em cultivos axênicos	Cultivo axênico de difícil obtenção e manutenção	CLARK & DIAMOND, 2002
Fatores de patogenicidade	Presença dos genes cp5 e ariel	Ausente	WILLHOEFT <i>et al.</i> , 1999a;1999b.
Genoma	2,2% de diferença nas sequências de genes do rDNA		CLARK & DIAMOND, 1991
Epidemiologia	<i>E. dispar</i> em geral mais frequente que a <i>E. histolytica</i> .		HAL <i>et al.</i> , 1997

2.4 DIAGNÓSTICO

2.4.1 Clínico

O diagnóstico clínico etiológico é difícil, uma vez que a amebíase não apresenta um padrão patognomônico. O quadro clínico se assemelha a de outras infecções intestinais causadas por vírus, parasitos, ou por diferentes espécies de

bactérias como, por exemplo, *Salmonella*, *Campylobacter* e *Shigella dysenteriae* entre outras (TANYUKSEL & PETRI, 2003).

2.4.2 Laboratorial

2.4.2.1 Pesquisa do complexo *E. histolytica/dispar* - Microscopia ótica.

A pesquisa de cistos/trofozoítos nas fezes pela técnica microscópica é ainda bastante utilizada para o diagnóstico da amebíase intestinal (GONZALEZ-RUIZ *et al.*, 1994a). No entanto, este procedimento tem sido reavaliado desde a descoberta da existência de duas espécies de *Entamoeba*, que apesar de possuírem as mesmas características morfológicas, são diferentes com relação à capacidade de causar doença (DIAMOND & CLARK, 1993).

Os métodos coproparasitológicos não permitem a identificação específica quando o diagnóstico é realizado pelo encontro de cistos e/ou trofozoítas nas fezes. Nestes casos o resultado deve ser expresso como infecção pelo complexo *E. histolytica/E. dispar*. Isto pode ser equivocadamente interpretado como amebíase, levando a superestimativa do número de casos, uma vez que a infecção pela *E. dispar* é cerca 10 vezes mais frequente que a *E. histolytica*. Uma consequência desta interpretação é a realização de tratamentos desnecessários (PETRI & SIGH, 1999; HAQUE & PETRI, 2006).

A microscopia, no entanto, pode ser utilizada como método de rastreamento de cistos em fezes. As amostras fecais positivas são posteriormente submetidas a testes que permitem a identificação específica como pesquisa de antígeno, ou isolamento de sequências genômicas do parasito. Desta forma, o custo é menor caso fossem utilizados métodos discriminatórios em todas as amostras na rotina.

2.4.2.2. Pesquisa de Antígeno – Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O imunodiagnóstico pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígenos do parasito nas fezes tem sido utilizado em inquéritos epidemiológicos no mundo (URDANETA *et al.*, 1994; HAQUE *et al.*, 1998; HAQUE *et al.*, 2000; BLESSMANN *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2005; DOURADO *et al.*, 2006). O teste é baseado na detecção de uma adesina responsável pela mediação da ligação dos trofozoítos às células da mucosa intestinal (lectina inibidora de N-acetil-D-

galactosamina), presente exclusivamente na membrana da *E. histolytica* (HUSTON *et al.*, 1999).

Vários “kits” de ELISA estão disponíveis no comércio como o *E. histolytica* II (*E. histolytica* Test, TechLab Inc., Blacksburg, Estados Unidos). Este teste apresenta boa sensibilidade (96,9% a 100%) e especificidade (94,7% a 100%) detectando cerca de 0,2 a 0,4ng de adesina. A técnica consiste na utilização de anticorpos policlonais antiadesina imobilizados na microplaca, que se ligam a adesina da *E. histolytica*/*E. dispar*, e um anticorpo monoclonal conjugado a peroxidase específico para adesina de *E. histolytica* (HAQUE *et al.*, 2000; FOTEDAR *et al* 2007a).

2.4.2.3. Pesquisa de DNA – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Técnicas de biologia molecular como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido comumente empregadas para o diagnóstico de doenças genéticas e infecciosas, análise de genes, e detecção e diferenciação de espécies morfológicamente idênticas como no presente estudo.

A realização da PCR requer os seguintes componentes essenciais: o DNA molde, uma DNA polimerase termoestável (*Taq* polimerase), um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), e os nucleotídeos que compõem a molécula de DNA (dNTP's). A localização da seqüência alvo é feita a partir dos iniciadores, e a síntese da região-alvo de interesse do DNA feita com a participação da *Taq* polimerase.

A amplificação ocorre durante repetidos ciclos de temperatura em equipamentos denominados termocicladores para: desnaturação do DNA molde por aquecimento (~94°C), pareamento dos oligonucleotídeos às seqüências-alvo (45°C a 70°C), e finalmente extensão dos iniciadores pela DNA polimerase termoestável (síntese do DNA) (~72°C). Ao fim do processo a concentração de DNA estará amplificada até cerca de um bilhão de vezes. O DNA resultante é visualizado e identificado em géis de agarose ou poliacrilamida (SINGH, 1997; MOLINA & TOBO, 2004).

A amplificação de seqüências específicas do DNA de *Entamoeba* pela PCR tem provado ser sensível (94%) e específica (100%), e tem sido amplamente utilizada para diagnóstico da infecção, inclusive em estudos epidemiológicos. O

conhecimento da distribuição da *E. histolytica* e da *E. dispar* é essencial para a tomada de decisões com relação às medidas de controle e ao tratamento (TANYUKSEL & PETRI, 2003; YERA *et al.*, 2003; DOGANCI *et al.*, 2004; CALDERARO *et al.*, 2005). Pesquisas têm demonstrado a aplicação bem sucedida de PCR para estes fins (ACUNA-SOTO *et al.*, 1993; RIVERA *et al.*, 1996; BRITTEN *et al.*, 1997; NUNEZ *et al.*, 2001; BLESSMANN *et al.*, 2002; SANCHEZ-GUILLEN *et al.*, 2002; GONIN & TRUDEL, 2003; VERWEIJ *et al.*, 2004; LEIVA *et al.*, 2006). Não há, no entanto, um método padronizado da PCR para o diagnóstico específico da infecção por *Entamoeba*. Diferentes autores utilizam métodos distintos para extração do DNA, sequências de iniciadores diversas para amplificação dos fragmentos gênicos do DNA-alvo, e estratégias variadas de amplificação como RAPD-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA) (VALLE *et al.*, 2000), PCR-SHELA (Polymerase chain reaction-solution hybridization enzyme-linked immunoassay) (VERWEIJ *et al.*, 2000; 2004), Multiplex-PCR (NUNEZ *et al.*, 2001), PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (HOOSHYAR *et al.*, 2004) Real Time-PCR (ROY *et al.*, 2005) e Nested-PCR (RIVERA *et al.*, 2006).

Para que a PCR realizada diretamente em amostras de fezes apresente bons índices de acurácia é necessária a extração do DNA livre de impurezas (inibidores) presentes no material fecal, tais como: sais biliares, bilirrubina, etanol, uréia, hemoglobina, heparina e carboidratos complexos, que podem interferir na amplificação (KREADER, 1996; LANTZ *et al.*, 1997). Outro agravante é que a grande parte das amostras de fezes analisadas na rotina dos laboratórios apresenta formol como conservante. O formol é caracterizado como inibidor da PCR a depender da concentração e tempo de preservação da amostra (RAMOS *et al.*, 1999).

2.4.2.4. Cultura de material fecal

O desenvolvimento de meios sintéticos para o cultivo de amebas permitiram sua manutenção *in vitro* e obtenção do parasito em maior quantidade para estudos sobre a biologia do parasito. O meio de Robinson e TYSGM-9 de Diamond são os mais utilizados para cultivo axênico da *E. histolytica* (CLARK & DIAMOND, 2002).

A principal desvantagem do diagnóstico baseado no isolamento em cultura do parasito é a impossibilidade de excluir a hipótese de uma espécie inibir o

desenvolvimento de outra em casos de infecção mista. Além disso, na rotina laboratorial o procedimento é laborioso, o custo é elevado, exige profissionais capacitados para a visualização e identificação dos trofozoítos, e nem sempre há sucesso na execução (TANYUKSEL & PETRI, 2003).

Hooshyar e colaboradores (2004) avaliaram 16.592 amostras de fezes da população do Irã e obtiveram 226 amostras positivas na microscopia ótica. Em apenas 101 delas foram isolados parasitos, o que resultou em uma perda de 55,3% (101/226) das amostras devido a problemas inerentes ao cultivo dos trofozoítos. A identificação específica foi realizada pela PCR a partir dos parasitos provenientes do cultivo. As vantagens de analisar parasitos previamente isolados em cultura pela PCR são a redução da presença de possíveis inibidores presentes nas fezes e o aumento da quantidade do DNA-alvo na amostra, que melhoram expressivamente o desempenho da PCR.

2.5 EPIDEMIOLOGIA DA AMEBÍASE

2.5.1. Situação epidemiológica mundial

A situação epidemiológica da amebíase mudou completamente desde a separação das espécies de *Entamoeba*: *E. histolytica* e *E. dispar*. Estudos realizados em diversas regiões do mundo revelaram prevalências variáveis da doença. Na África do Sul e Egito a prevalência é maior que 20% (STAUFFER *et al.*, 2006), no Irã 7,9% (HOOSHYAR *et al.*, 2004), na Turquia 13% (TANYUKSEL *et al.*, 2005) e na Nicarágua 1,5%, (LEIVA *et al.*, 2006). No Vietnã, na cidade de Hue, a incidência é de cerca de 21 novos casos de amebíase hepática a cada 100.000 habitantes por ano (BLESSMANN *et al.*, 2002). A amebíase é a quinta doença mais prevalente na população mexicana, sendo considerada um importante problema de saúde pública (XIMÉNEZ, 2006). Em Bangladesh, a prevalência da amebíase varia de 1% a 4,3% em crianças a depender do local – área urbana ou rural (HAQUE *et al.*, 1997, 2001). No entanto, em países como a Grécia, não parece ser um problema relevante (EVANGELOPOULOS *et al.*, 2001).

Os grupos de risco para amebíase incluem viajantes e moradores de áreas endêmicas, imunodeprimidos, homossexuais ativos e crianças abaixo de 15 anos de idade, porém situação socioeconômica e condições sanitárias inadequadas

predispõem todos os indivíduos à infecção pelo parasito (HAQUE *et al.*, 2003; TANYUKSEL & PETRI, 2003; BRAGA *et al.*, 1998; STANLEY, 2003).

2.5.2. Distribuição geográfica no Brasil

No Brasil, existem diferenças quanto à frequência da parasitose de acordo com o local pesquisado. Os índices mais elevados da infecção foram observados em Belém-Pará com cerca de 29% de indivíduos examinados albergando a *E. histolytica* (POVOA *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2005). Em Fortaleza-Ceará foram encontradas prevalências de até 14,9%, e em Manaus 6,8% (BRAGA *et al.*, 2001; BENETTON *et al.*, 2005). Em Pernambuco, até o presente, nenhum caso de infecção devido a *E. histolytica* foi detectado (ACA *et al.*, 1994; PINHEIRO *et al.*, 2004; DOURADO *et al.*, 2006).

2.6 PREVENÇÃO E CONTROLE

A prevenção e controle da amebíase requer primariamente medidas de induzam a interrupção do ciclo evolutivo, como saneamento básico, higiene pessoal e tratamento de água (MARSHALL *et al.*, 1997).

Vários antígenos de *Entamoeba* já mostraram ser imunogênicos, podendo ser usados como alvo para o desenvolvimento de vacinas, tais como: proteína rica em serina de *E. histolytica*, lectina N-acetil-D-galactosamina, cisteína proteinases, lipofosfoglicanos, amebaporos, e uma proteína de 29-kDa (CHAUDHRY & PETRI, 2005). Embora significativos avanços no conhecimento científico venham sendo relatados, os mecanismos envolvidos na imunidade protetora não estão completamente definidos (SHIBAYAMA *et al.*, 2008; STANLEY, 2006). Portanto, apesar do impacto que uma vacina contra a *E. histolytica* teria sobre morbidade e mortalidade causadas pela amebíase, seu desenvolvimento para prevenção desta enfermidade ainda é um a promessa futura (PETRI & SINGH, 1999).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Discriminar a infecção causada pela *Entamoeba histolytica* e *E. dispar* na população de escolares da rede pública da cidade de Maceió-AL.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar a frequência dos parasitos intestinais em escolares usuários do sistema público estadual de ensino de Maceió – AL;
- Indicar o perfil socioeconômico das famílias dos escolares examinados;
- Padronizar a reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação específica da infecção da *E. histolytica* e *E. dispar* ;
- Estimar a prevalência da amebíase na população de escolares pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) e pela PCR;
- Comparar as técnicas de ELISA e PCR para o diagnóstico da amebíase.
- Avaliar a distribuição e ocorrência da *E. dispar* na população estudada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. DESCRIÇÃO DA ÁREA

O município de Maceió localiza-se no litoral médio do Estado de Alagoas, limitado pelos paralelos 9°35'S e 9°24'S e meridianos 35°44'W e 35°56'W (IMPAR, 1995). Compreende uma área de 511Km² e uma população de 896.965 habitantes, representando uma densidade demográfica de 1.755,3 habitantes/Km² (IBGE 2008).

O clima regional é caracterizado como quente e úmido durante praticamente todo o ano, com médias mensais de temperatura que variam de 24°C a 28°C (IMPAR, 1995). O município é dividido em 50 bairros e 56 localidades rurais, estando 99,7% da população situada na zona urbana e apenas 0,3% na área rural (CCZ, 2007).

O sistema coletor de esgotos sanitários na cidade de Maceió atende cerca de 170.000 habitantes, totalizando apenas 27% da população, sendo a cobertura do abastecimento de água tratada de 41,6% (CASAL, 2007; CCZ, 2007).

As condições socioeconômicas e habitacionais da população de forma geral são bastante precárias, com 8,21% dos domicílios estabelecidos em assentamentos precários ou subnormais (MARQUES *et al.*, 2007).

4.2. DESENHO DO ESTUDO

No presente estudo foi realizado um inquérito epidemiológico pontual do tipo corte transversal, utilizando amostragem proporcional em múltiplos estágios, sendo o comportamento das amostras equivalente ao da população. O inquérito foi realizado no período de março de 2008 a dezembro de 2009.

4.2.1. Definição e cálculo do tamanho da amostra

A população-alvo escolhida foi escolares da rede pública estadual de ensino da cidade de Maceió-AL na faixa etária de 4-15 anos, uma vez que estes pertencem ao grupo de maior risco para aquisição da infecção (XIMÉNES *et al.*, 2009). O baixo padrão socioeconômico e as condições sanitárias inadequadas que aos quais a presente população pode estar exposta, aumenta a possibilidade da presença do parasito.

A amostra avaliada foi retirada de uma população constituída de 67.738 escolares de 4-15 anos do ensino fundamental da rede pública estadual da cidade de Maceió (SEEE, 2008). De acordo com o censo da Secretaria de Estado da Educação e do Esporte de Alagoas (SEEE) os estudantes estão distribuídos em 102 escolas públicas no município de Maceió. Todas as escolas estão alocadas em quatro Coordenadorias de Ensino (CES) que correspondem às áreas administrativas de Maceió.

Para a determinação do número de escolares a serem avaliados foram utilizados os seguintes parâmetros: 20% de erro aceitável, intervalo de confiança de 95% e 11% de frequência esperada para o complexo *E. histolytica/E. dispar*. Esta frequência foi estimada por Queiroz e colaboradores (2008), que realizaram inquérito parasitológico em moradores da comunidade do Vale do Reginaldo da mesma faixa etária dos escolares. Este cálculo resultou em uma amostra mínima de 768 escolares a serem avaliados.

As escolas foram estratificadas nas quatro CES (1º, 13º, 14º e 15º), de acordo com a organização da SEEE, representando as áreas geográficas da cidade de Maceió. Nesta etapa foi realizada uma divisão proporcional do número de alunos/escolas correspondente a cada CES na faixa etária alvo.

Em cada CES as escolas foram estratificadas de acordo com a média geral de alunos (645 alunos por escola) resultando em dois grupos de escolas. Um grupo formado por escolas que apresentaram o número total de alunos igual ou superior a média geral, ou seja, 645 alunos, e outro grupo constituído de escolas com número de estudantes abaixo desta média (< 645 alunos). Esse critério foi adotado devido à possibilidade dos alunos de escolas maiores apresentarem características diferentes daqueles que frequentavam escolas menores.

De acordo com o delineamento acima descrito, de cada grupo foram sorteadas duas escolas, de modo a se avaliar em cada uma delas um número mínimo de escolares segundo o cálculo amostral (Figura 4).

4.3. CRITÉRIO DE INCLUSÃO

Para participação no presente estudo os critérios de inclusão adotados foram: estudar na escola pública estadual sorteada, apresentar idade na faixa etária 4-15 anos, assinatura dos responsáveis do Termo de Consentimento Livre e

Esclarecido - TCLE (Apêndice 1) e entrega das fezes. Vale ressaltar que o presente critério de inclusão pode originar um viés de exclusão das crianças sintomáticas eventualmente ausentes no momento da realização do inquérito na escola.

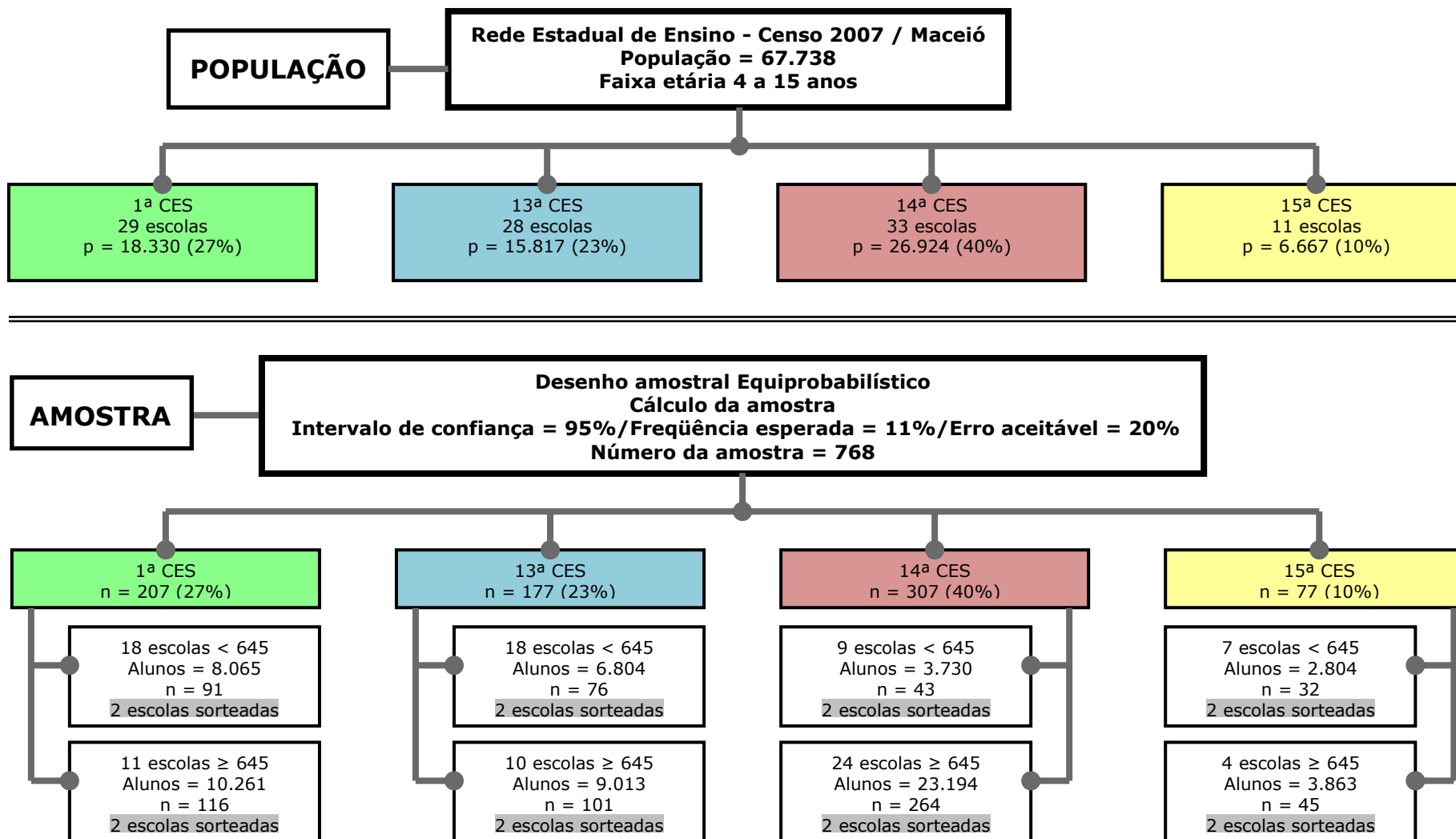


Figura 4: Distribuição dos escolares por Coordenadoria de Ensino (CES), estratificados por média de alunos por escola (645 escolares), e definição do número de escolares a serem avaliados em cada CES.

4.4. SISTEMATIZAÇÃO NO CAMPO

As atividades de campo foram realizadas de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 5.

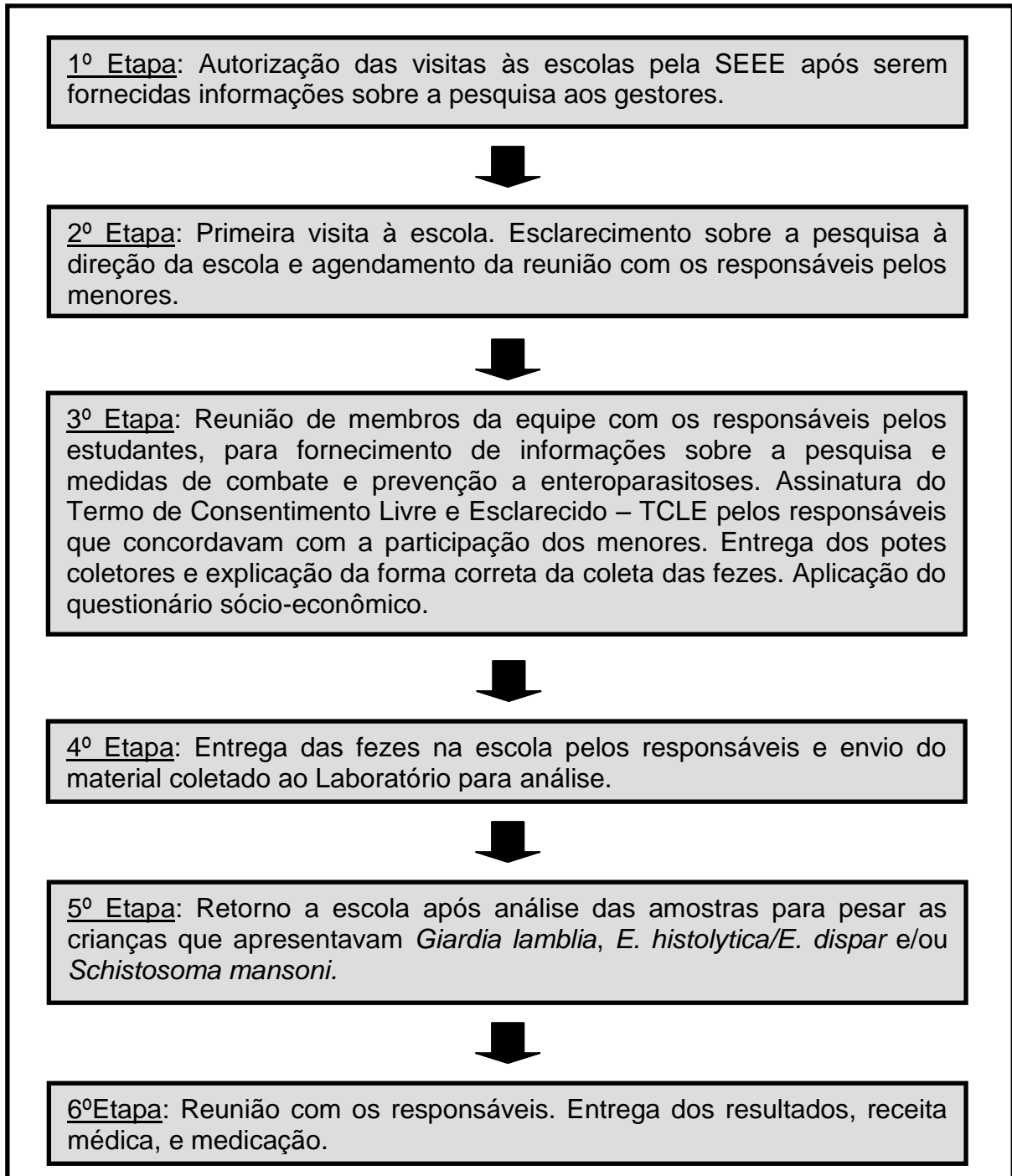


Figura 5: Fluxograma das atividades desenvolvidas no campo.

4.4.1. Aplicação do questionário

Para obtenção das informações relativas às variáveis socioeconômicas, ambientais e biológicas, foi aplicado um questionário padronizado aos responsáveis pelos menores (Apêndice 2).

4.4.2. Dados Socioeconômicos - Critério Brasil

As variáveis referentes às características econômicas foram: renda familiar, posse de bens e grau de instrução do chefe da família. Variáveis foram utilizadas para determinação da classe econômica pelo sistema de pontos padronizado e classificado como “Critério Padrão de Classificação Econômica Brasil/2008” (ABEP, 2008). Esse critério utiliza como base de classificação a posse de bens e grau de instrução do chefe da família, que são pontuados para determinação da classe econômica.

O critério Brasil enfatiza o poder de compra das famílias residentes em áreas urbanas determinando de forma real a “classe econômica”. A vantagem desse critério é a abolição da distribuição dos indivíduos em “classes sociais” (ABEP, 2008).

4.5. ASPECTOS ÉTICOS

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Alagoas, registro nº 257_11388478 (Anexo 1). Os responsáveis pelos menores de idade foram esclarecidos quanto à pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) conforme normas do CEP (Apêndice 2).

4.5.1. Tratamento antiparasitário

O tratamento foi realizado em todos os escolares infectados com qualquer enteroparasito e/ou *Schistosoma mansoni*.

A prescrição e o acompanhamento clínico foram realizados sob supervisão da Dra. Iasmin de Albuquerque Cavalcanti Duarte da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Alagoas, e os medicamentos foram fornecidos pela Secretaria Municipal de Saúde de Maceió.

4.6. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

4.6.1. Exame Parasitológico de Fezes

As amostras de fezes foram entregues nas escolas participantes do estudo pelo responsável do menor, e transportadas para o Laboratório de Filarioses e Geohelmintoses da Universidade Federal de Alagoas para processamento de acordo com o diagrama apresentado na Figura 6.

A pesquisa de parasitos foi feita pelo método de sedimentação espontânea (HOFFMANN *et al.*, 1934). Para tal, aproximadamente 5g da amostra de fezes sem conservante era diluída em água com auxílio de um bastão de vidro. Em seguida a suspensão das fezes era filtrada em gaze cirúrgica dobrada quatro vezes, e recolhida em cálice cônico de 200mL. O volume do cálice era completado com água e a suspensão deixada em repouso por um período de 2 a 24 horas, para sedimentação de larvas, ovos ou cistos de parasitos porventura presentes. O exame microscópico foi feito em uma alíquota do sedimento das fezes depositada sobre uma lâmina com uma gota de Lugol 2% (2g I₂ + 2g KI – H₂O q.s.p. 100mL), coberta com lamínula. A solução de Lugol era utilizada para facilitar a identificação dos cistos de protozoários, ovos e larvas de helmintos.

O diagnóstico foi realizado após a leitura de quatro lâminas para cada amostra fecal, por quatro técnicos diferentes para aumentar a sensibilidade do diagnóstico para o complexo *E. histolytica/E. dispar*. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio ótico no aumento de 100x para pesquisa de ovos e larvas de helmintos, e aumento de 400x para pesquisa de cistos de protozoários.

4.6.1.1. Armazenamento das fezes

Uma alíquota de cada amostra fecal dos estudantes, antes do processamento pelo método de sedimentação espontânea, era armazenada em três microtubos tipo *Eppendorf*, e mantidos a -80°C para análise posterior pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) (Figura 6).

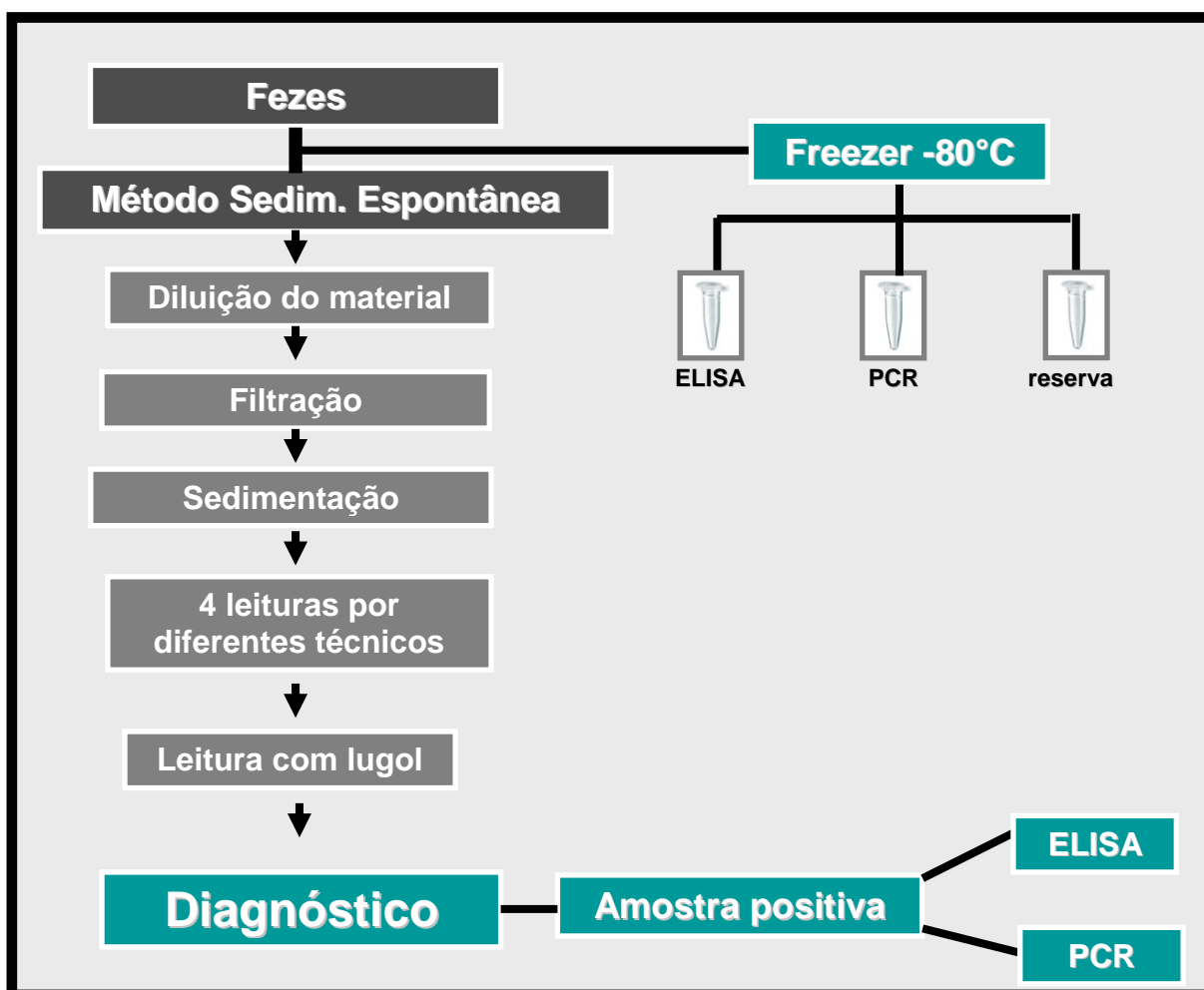


Figura 6: Diagrama do método de sedimentação espontânea e armazenamento das amostras de fezes.

4.7. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA AMEBÍASE

4.7.1. Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

O diagnóstico pela PCR foi realizado em todas as amostras de fezes positivas para o complexo *E. histolytica*/*E. dispar* pela microscopia ótica, e os resultados utilizados também para comparação entre as diferentes técnicas (microscopia ótica e ELISA).

4.7.1.2. Controle Positivo

Como controle positivo para *E. histolytica* foi utilizado DNA extraído de parasitos provenientes de cultura padrão axênica, e para *E. dispar* DNA extraído de parasitos mantidos em cultura poliaxênica. As amostras de cultura foram gentilmente

cedidas pelo Dr. Edward Félix da Silva do Laboratório de Amebíase do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.7.1.3. Seleção e análise virtual *in silico* dos iniciadores descritos na literatura para detecção da *E. histolytica* e *E. dispar*

O objetivo desta etapa foi selecionar os iniciadores descritos na literatura com melhor desempenho para o diagnóstico da amebíase. Para tal, foi utilizada a bioinformática para conferir o alinhamento dos iniciadores com o genoma do parasito e/ou sequências depositados em bancos de dados genéticos.

Foram selecionados trabalhos publicados que usaram a PCR para detecção da *E. histolytica/E. dispar* no período 1991-2007.

Para análise da especificidade dos iniciadores foram utilizados indicadores de cada alinhamento através do BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide), tais como: score, valor E, identidade máxima e a cobertura do sense e antisense de cada iniciador. O alinhamento das sequências de cada iniciador contra o GenBank (National Center for Biotechnology Information - NCBI) foi validado com o auxílio do programa GeneRunner v.3.05 de domínio público (Figura 7).

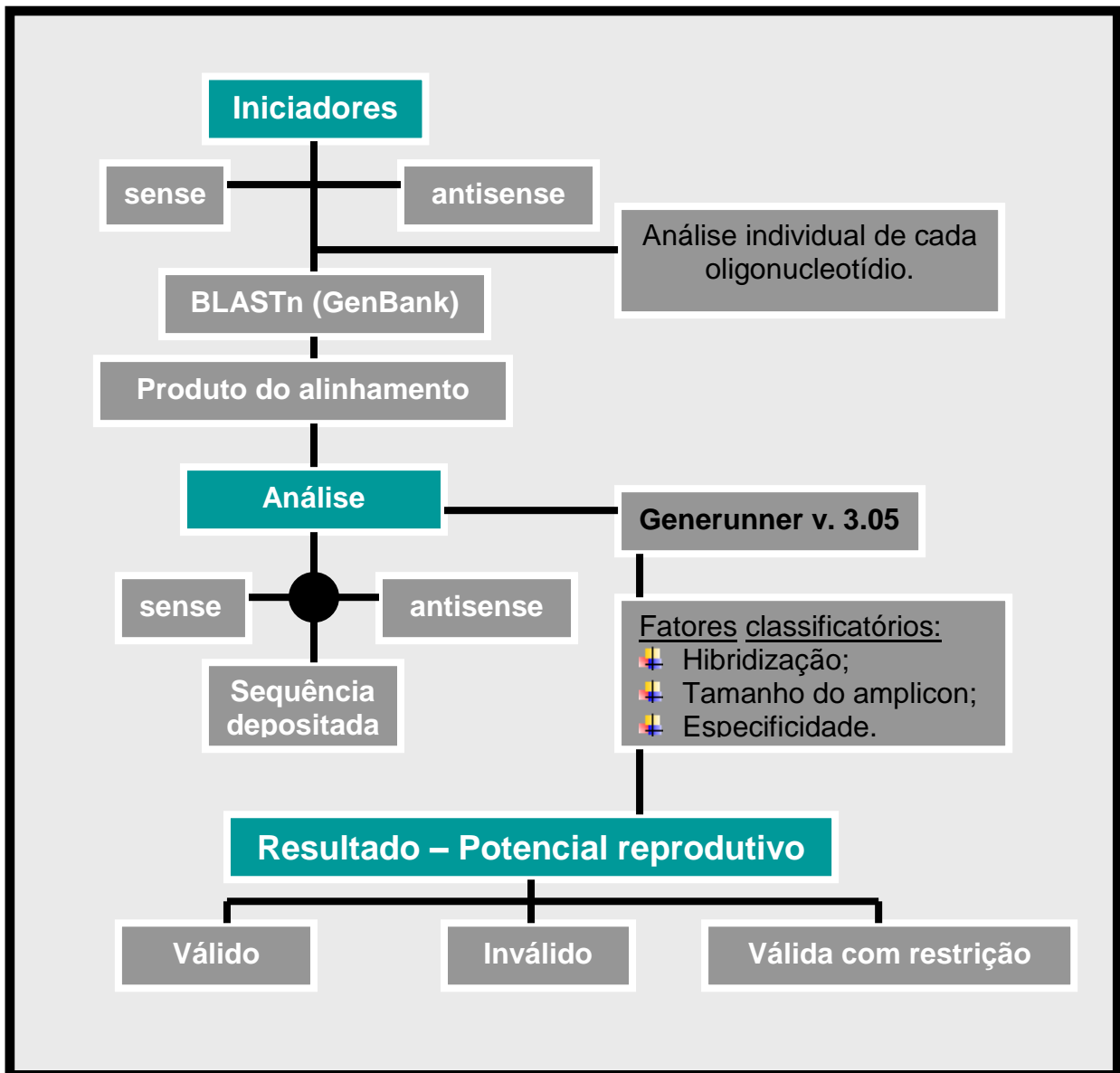


Figura 7: Diagrama da análise virtual dos iniciadores descritos na literatura para a detecção da *E. histolytica* e *E. dispar*.

4.7.1.4. Extração do DNA

A depender do material a ser processado (fezes ou cultura) foi necessário adaptar o método de extração do DNA. Nas fezes o parasito pode estar presente em pequena quantidade, e é encontrado em geral na forma de cistos, que são mais resistentes ao rompimento para liberação do material genômico, e estão misturados a inibidores que limitam a atividade enzimática da DNA polimerase. Estes fatores devem ser levados em consideração, pois podem interferir no desempenho da técnica. Em cultura há menor probabilidade da interferência de inibidores, há maior quantidade do DNA-alvo e a forma evolutiva encontrada é o trofozoíto, o que facilita o processo de lise celular para liberação do DNA genômico.

A extração do DNA dos controles positivos (cultura) foi realizada de acordo com Sambrook e colaboradores (1987), com algumas modificações, conforme descrito a seguir:

- 1) Foram adicionados 10 μ L da cultura em 500 μ L de tampão de extração (1%);
- 2) Em seguida, foram acrescentados 5 μ L proteinase K (QIAamp®), sendo o material incubado por 10 minutos a 70°C em bloco térmico (FINEPCR® Thermo Bath ALB64);
- 3) Acrescentou-se no mesmo tubo igual volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). O material foi homogeneizado durante 3 minutos por agitação manual, seguido de centrifugação por 3 minutos a 12.000 rpm;
- 4) Removeu-se o sobrenadante para um novo tubo e repetindo-se a etapa 3;
- 5) O sobrenadante foi depositado em uma coluna de concentração de DNA Microcon (YM-100, Millipore®) e centrifugado a 8.000 rpm durante 10 minutos;
- 6) Descartou-se o material filtrado sendo adicionada à membrana 200 μ L de água ultra-pura. Centrifugou-se o material a 8.000 rpm durante 10 minutos. Este procedimento era repetido por mais uma vez;
- 7) O DNA preso na coluna de concentração foi ressuspendido em 50 μ L de TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 7,4). A coluna foi invertida em um novo tubo e o material centrifugado a 12.000 rpm durante 3 minutos;
- 8) O DNA extraído foi acondicionado a -20°C para posterior análise pela PCR.

A extração do DNA das amostras de fezes foi realizada utilizando o *Kit Spin Stool DNA PSP* (Invitek®), de acordo com instruções do fabricante, como descrito a seguir:

- 1) Transferiu-se 200-400mg de fezes para um microtubo de 2 mL;
- 2) Adicionou-se 1.200 μ L de *Lysis buffer P* agitando-se no vórtex continuamente durante 1 minuto;
- 3) O material foi então incubado durante 10 minutos a 95°C em bloco térmico, em seguida no gelo durante 1 minuto, e novamente a 95°C em bloco térmico durante 5 minutos;
- 4) O material foi centrifugado durante 6 minutos a 12.000 rpm;

- 5) Após transferência de todo o sobrenadante para o *Invi-Adsorb-Tube*, agitou-se o material em vórtex continuamente durante 15 segundos, incubando a suspensão durante 1 minuto em temperatura ambiente;
- 6) Foi repetida a etapa 4;
- 7) O sobrenadante foi transferido para um microtubo novo de 1,5ml. O precipitado foi descartado, e a etapa 4 repetida;
- 8) Foi adicionado 25µL de proteinase K em um novo microtubo de 1,5ml. Em seguida 400µL do sobrenadante da etapa 7 foi adicionado. Toda amostra foi agitada e incubada durante 10 minutos a 70°C em bloco térmico;
- 9) Adicionou-se 400µL de *Binding Buffer P* ao lisado e agitou-se no vórtex continuamente durante 15 segundos. Em seguida toda amostra foi transferida para *Spin filter*, sendo incubado durante 1 minuto a temperatura ambiente;
- 10) O material foi centrifugado durante 3 minutos a 12.000 rpm e o filtrado descartado;
- 11) Foi adicionado 500µL de *Wash Buffer I* no *Spin Filter*, e repetida a etapa 11;
- 12) Foi adicionado 800µL de *Wash Buffer II* no *Spin Filter*, e repetida a etapa 11;
- 13) Para remoção do etanol foi repetida a etapa 4.
- 14) O *Spin filter* foi colocado em um novo microtubo de 1,5ml, foram adicionados 200µL de *Elution Buffer D* (70°C). A amostra foi centrifugada a 8000 rpm durante 1 minuto para eluição do DNA.
- 15) O DNA extraído foi acondicionado a -20°C para posterior análise pela PCR.

4.7.1.5. Amplificação

A reação em cadeia da polimerase foi realizada de acordo com Rivera e colaboradores (1996) com as seguintes modificações: o volume final foi reduzido de 50µL para 25µL, diminuindo a quantidade de reagente e conseqüentemente o custo, e a concentração de soro albumina bovina (BSA) foi reduzida de 500ng para 400ng como preconizado por Kreader (1996).

O *mix* era composto de 20mM Tris-HCl, 50mM KCl, 200µM de dNTP, 1,5mM de MgCl₂, 20pM de cada iniciador (p11plus/ p12plus e p13plus/p14plus), 2U de *Taq* Polimerase Platinum (Invitrogen®), 400ng de BSA, 2µL de DNA e H₂O ultra-pura q.s.p. 25µL. A programação do termociclador (PCR Express Thermo Hybaid®, UK)

consistiu em 35 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 59°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 1 minuto (extensão).

4.7.1.6. Detecção do produto amplificado

Após a amplificação, 10µL de cada produto da PCR foi aplicado em gel de Agarose 2% a 100V durante uma hora, revelado com brometo de etídio (10 mg/mL), visualizado sob luz ultravioleta (Vilber Lourmat® TFX-20.M, Alemanha) e fotodocumentado (Vilber Lourmat DP-001 FDC, Alemanha). A análise dos resultados foi realizada com auxílio do programa de computação (PhotoCaptMw version 10.01 for Windows).

4.7.2. Ensaio Imunoenzimático – ELISA

O ensaio imunoenzimático foi realizado em todas as amostras de fezes positivas na microscopia ótica para o complexo *E. histolytica/E. dispar*.

Para realização do ensaio imunoenzimático foi escolhido o *Kit* comercial *E. histolytica* II® (Techlab, Blacksburg, Virginia, USA). O princípio da técnica consiste na detecção da adesina da *E. histolytica* utilizando anticorpos antiadesina. As microplacas (96 cavidades) são fornecidas previamente sensibilizadas com anticorpos policlonais que se ligam a adesina do complexo *E. histolytica/E. dispar*. O conjugado é um anticorpo monoclonal ligado a peroxidase específico para a adesina da *E. histolytica*.

Em cada cavidade da microplaca foi adicionada uma alíquota da amostra fecal emulsificada no diluente. Em seguida a microplaca foi incubada à temperatura ambiente durante 2 horas. Quando havia adesina na amostra, ocorria a ligação com o conjugado e o anticorpo policlonal imobilizado na placa. O material não ligado era removido durante as etapas de lavagem. A adição do substrato (tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio) na presença do complexo enzima-anticorpo-adesina induzia a formação de cor. Em todas as microplacas eram adicionados controles positivo e negativo.

4.7.2.1. Leitura e Interpretação dos Resultados

A microplaca foi analisada em espectrofotômetro a 450nm (Thermo Plate® TP-Reader). A absorbância apresentada pelo controle negativo foi subtraída da leitura

das cavidades do controle positivo e das amostras.

Uma amostra era considerada positiva para a presença da adesina quando apresentava absorvância $\geq 0,050$ (após subtração do valor de absorvância do controle negativo), e classificada como negativa quando o valor era inferior a 0,050.

4.8. DETERMINAÇÃO DA ACURÁCIA DAS TÉCNICAS

Para mensuração dos verdadeiros casos identificados na microscopia foi determinado o Valor Preditivo Positivo (VPP) utilizando como referência a pesquisa de antígeno (ELISA).

Para comparação da PCR versus ELISA foi determinado o Valor Preditivo Negativo (VPN), Valor Preditivo Positivo (VPP), sensibilidade e especificidade (Figura 8).

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de verdadeiros positivos} \times 100}{\text{Total de doentes}}$$
$$\text{Especificidade} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de verdadeiros negativos} \times 100}{\text{Total de sadios}}$$
$$\text{Valor preditivo positivo} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de verdadeiros positivos no teste} \times 100}{\text{Total de positivos no teste}}$$
$$\text{Valor preditivo negativo} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de verdadeiros negativos no teste} \times 100}{\text{Total de negativos no teste}}$$

Figura 8 – Fórmulas utilizadas para mensuração da qualidade das técnicas no diagnóstico da amebíase.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa de computador Epi-Info versão 3.5.1 (Centers for Disease Control and Prevention). O χ^2 (qui-quadrado) e teste “t” de Student foram usados para comparar proporções e médias, respectivamente. Riscos foram estimados por “Odds” relativa (OR) ou razão de chance (KAHN & SEMPOS, 1989).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Total	461	46.0	542	54.0	1.003
-------	-----	------	-----	------	-------

5.2. PARASITÓSES INTESTINAIS

Um total de 54,8% (550/1.003) dos escolares estava parasitado por pelo menos uma espécie de helminto ou protozoário ($p < 0,05$) (Tabela 2). Estes dados são semelhantes aos obtidos por outros autores em diferentes regiões do país. Girdali e colaboradores (2001) observaram 52,5% (228/434) de positividade para enteroparasitoses escolares na faixa etária de 6-10 anos em Rolândia-PR. Macedo (2005), avaliando escolares da rede pública de Paracatu-MG detectaram 62% de positividade para parasitos e/ou comensais intestinais.

Em geral o aumento da idade coincidiu com o aumento dos casos de poliparasitismo. Entretanto, como o presente estudo é de corte transversal, para confirmação deste dado é necessário quantificar o avanço das parasitoses intestinais com estudo de incidência. A faixa etária de 12-15 foi a que apresentou a maior taxa de poliparasitismo (56,6%) (Figura 10).

5.2.1. Frequência das parasitoses intestinais.

A frequência das espécies detectadas na microscopia óptica está apresentada na Tabela 3. A espécie de parasito mais freqüente foi o protozoário *Giardia lamblia* com 24,6% de casos. O *Ascaris lumbricoides* foi o helminto mais freqüente (13,1%) seguido do *Trichures trichiura* (9,7%) (Tabela 3).

Costa-Macedo e colaboradores, (1998) e Buschini e colaboradores, (2007), avaliando crianças no Rio de Janeiro e no Paraná, respectivamente, detectaram maior ocorrência de infecções por protozoários que por helmintos corroborando com os resultados do presente estudo.

A esquistossomose mansônica foi observada em 1,5% (15/1.003) dos escolares avaliados. No entanto este dado pode estar subestimado, uma vez que, o método de sedimentação espontânea não é o mais adequado para a detecção do *Schistosoma mansoni* em fezes.

Tabela 2 – Distribuição dos resultados dos exames parasitológicos de fezes de acordo com a faixa etária nos escolares da rede pública.

Faixa etária (anos)	Resultado				Total
	Positivo		Negativo		
	n	%	n	%	
4-7	128	53,6	111	46,4	239
8-11*	277	54,5	231	45,5	508
12-15*	145	56,6	111	43,4	256
Total*	550	54,8	453	45,2	1.003

* $p < 0,05$

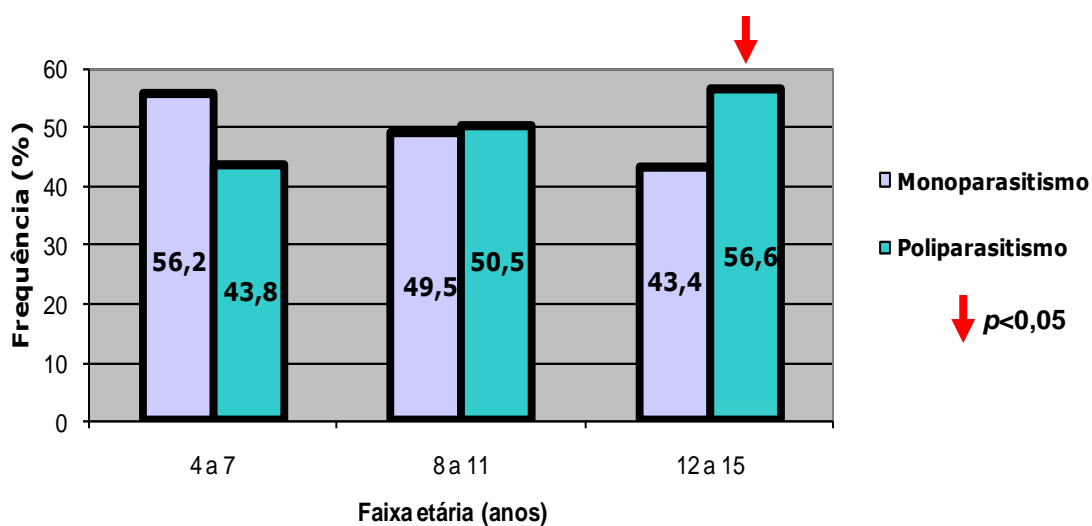


Figura 10 – Frequência de monoparasitismo e poliparasitismo de acordo com a faixa etária, em escolares da rede pública da cidade de Maceió-AL.

Tabela 3 – Frequência de parasitos nos escolares da rede pública de ensino da cidade de Maceió-AL.

Parasito *	Frequência	
	%	n
Helmintos		
<i>Ascaris lumbricoides</i>	13,1	131
<i>Trichuris trichiura</i>	9,7	97
Ancylostomatidae	6,1	61
<i>Strongyloides stercoralis</i>	4,5	45
<i>Enterobius vermicularis</i>	2,2	22
<i>Hymenolepis nana</i>	1,9	19
<i>Schistosoma mansoni</i>	1,5	15
Protozoários		
<i>Giardia lamblia</i>	24,6	247
<i>Entamoeba coli</i> **	19,0	191
<i>Endolimax nana</i> **	9,4	94
<i>Entamoeba histolytica/E. dispar</i>	6,4	64
<i>Iodoamoeba butschlii</i> **	0,4	4

*Inclui casos de poliparasitismo.

**Espécies comensais.

5.3. CARACTERIZAÇÃO SOCIOECONÔMICA

Do total de escolares participantes do estudo 54,4% (546/1.003) foram avaliados pelo Critério Brasil. Não foi possível realizar a avaliação socioeconômica em toda a amostra, pois, nem sempre havia disponibilidade de tempo dos responsáveis após as reuniões para responder ao questionário.

A maioria dos estudantes (57,5%) foi incluída na classe econômica D, o que indica baixo poder econômico da população amostrada (Tabela 4). Dos entrevistados, 83,1% apresentavam renda ≤ 1 salário mínimo, com 2-5 moradores/residência, sendo significativo o número de famílias que relataram residir em casas próprias (Tabela 5).

Tabela 4 – Distribuição dos escolares da rede pública de ensino da cidade de Maceió-AL por classe econômica.

Condições Socioeconômicas	Número de Avaliados	
	n	%
Classes econômicas* (n=546)		
B2	5	0,9
C1	24	4,4
C2	139	25,5
D**	314	57,5
E	64	11,7

*Segundo critério padrão de classificação econômica Brasil/2008 (ABEP, 2008). ** $p < 0,05$

Tabela 5 – Renda familiar, moradia e número de residentes no domicílio dos escolares da rede pública de ensino da cidade de Maceió-AL.

Condições Socioeconômicas	Avaliados	
	n	%
Renda familiar (salário*)		
≤1**	823	83,2
02	129	13,0
03	19	1,9
≥4	19	1,9
Moradia		
Própria**	712	72,2
Alugada	190	19,2
Cedida	73	7,4
Invadida	12	1,2
Número de residente no domicílio		
2 a 5**	682	68,9
6 a 9	279	28,2
10 a 12	27	2,7
13 a 15	2	0,2

* $p < 0,05$ **Valor do salário mínimo em 2008 - R\$ 415,00

5.3.1. Condições de moradia das famílias dos escolares.

O tipo de moradia mais comumente observado foi de alvenaria (88,0%), com banheiro (95,5%) e fossa rudimentar para destino dos dejetos sanitários (78,2%). Uma grande parcela das famílias avaliadas (64,0%) utilizava água para consumo de origem pública, em geral sem tratamento prévio ao consumo (66,8%). Este

comportamento foi igualmente observado na água para limpeza das louças e alimentos, com utilização da água direto da torneira (81,4%) (Tabela 6).

O conjunto de indicadores socioeconômicos está abaixo dos índices considerados adequados para atender as necessidades mínimas da população, e proporcionam condições para manutenção e transmissão de parasitos intestinais (FERREIRA & ANDRADE, 2005; SATURNINO *et al.*, 2005).

Tabela 6 – Condições de moradia dos escolares da rede pública de ensino da cidade de Maceió-AL.

Condições de moradia dos escolares (n=990)	Avaliados	
	n	%
Tipo de moradia		
Alvenaria*	871	88,0
Mista	23	2,3
Taipa	70	7,1
Outra	26	2,6
Presença de Banheiro		
Sim*	942	95,2
Não	48	4,8
Destino dos dejetos		
A céu aberto	130	13,1
Fossa rudimentar*	774	78,2
Fossa séptica	-	-
Rede coletora	44	4,4
Outro	42	4,2
Origem da água para consumo		
Água Industrializada	189	19,1
Açude	3	0,3
Poço	162	16,4
Publica*	634	64,0
Outra	2	0,2
Tratamento da água de consumo		
Clora	110	11,1
Ferve	57	5,8
Filtra	162	16,4
Nada*	661	66,8
Origem da água para limpeza da louças e alimentos		
Açude	3	0,3
Água industrializada	8	0,8
Poço	172	17,4
Publica*	806	81,4
Outra	1	0,1

*p<0,05

5.4. MICROSCOPIA ÓPTICA PARA DIAGNÓSTICO DA AMEBÍASE

A microscopia foi utilizada como método de triagem das amostras para a presença de cistos de *Entamoeba* e posterior análise por métodos específicos. A prevalência encontrada para o complexo *E. histolytica/E. dispar* foi de 6,4% (64/1.003).

Duarte (2006) avaliando a ocorrência da amebíase em 1.798 escolares da rede pública de Maceió-AL detectou na microscopia, 3,8% das amostras com *E. histolytica/E. dispar*, sendo este dado confirmado pelo Enzyme test® (LUACES & BARRET, 1998) que permite a detecção pelo método de ELISA do complexo *E. histolytica/E. dispar*. A microscopia quando realizada por técnicos capacitados e com a leitura de no mínimo quatro lâminas poderá ser utilizada como método de rastreamento de casos de amebíase. As amostras positivas para cistos da *Entamoeba* deverão, na sequência, ser submetidas a uma nova análise por métodos específicos reduzindo custo e tratamentos desnecessários.

Embora a microscopia seja um método de rotina laboratorial para o diagnóstico da amebíase em diversas regiões do mundo, não é a mais indicada por apresentar uma série de limitações, principalmente devido a impossibilidade de distinção dos cistos e trofozoítas de diferentes espécies de *Entamoeba* (HUSTON, 1999). Na Etiópia, Kebede e colaboradores (2004) diagnosticaram por microscopia 91 (39%) pacientes do estudo com trofozoítos e/ou cistos quadrinucleados. No entanto, utilizando a PCR para amplificação de segmentos gênicos de *E. histolytica* e *E. dispar* nenhum infectado por *E. histolytica* foi detectado, e somente 21 (9%) casos de *E. dispar* foram diagnosticados, indicando a presença de outras amebas intestinais. Pela microscopia, portanto, houve a produção de um número elevado de falso-positivos.

A liberação intermitente dos cistos pelos hospedeiros é outro limitante da técnica. No entanto, a sensibilidade pode ser melhorada em até 90% quando são coletadas e examinadas três amostras por indivíduo em diferentes dias (WALSH, FONTE, 2000). Outro fator que pode contribuir para a falha no diagnóstico é o exame do material por microscopistas mal treinados ou com pouca experiência (ACKERS, 2002).

5.5. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR

5.5.1. Seleção dos iniciadores: análise *in silico*

Foram analisados 56 trabalhos publicados no período de 1991-2009, sendo avaliados por bioinformática 34 iniciadores desenvolvidos para pesquisa do DNA de *Entamoeba*, principalmente para o diagnóstico específico da *E. histolytica* e *E. dispar* (Quadro 3).

Vários iniciadores apresentaram desempenho insatisfatório na análise através da bioinformática como: (a) alinhamento com sequências de outras espécies com formação virtual do amplicon; (b) ausência de alinhamento dos iniciadores com o genoma da espécie alvo; (c) distinção por polimorfismo (RFLP) inexistente entre o padrão da *E. histolytica* e outras espécies; (d) amplicon com número de bases acima ou abaixo do informado pelos autores.

Baseado na análise *in silico*, os iniciadores selecionados para a detecção da infecção causada pela *E. histolytica* e *E. dispar* foram o p11plus/p12plus e p13plus/p14plus, respectivamente. Os dois conjuntos de iniciadores foram desenvolvidos para amplificar regiões distintas para cada espécie, codificantes de uma proteína antigênica de 30 KDa rica em serina.

As características determinantes para a escolha dos iniciadores descritos no parágrafo anterior foram: alinhamento específico ao genoma da espécie correspondente, e valores adequados das variáveis relacionadas ao alinhamento, como *score* elevado e *valor-e* baixo (Quadro 3). O *score* é uma pontuação atribuída ao alinhamento que considera, entre outros fatores, a fidelidade no pareamento das duas seqüências, que devem possuir o mesmo comprimento, ter todas as suas bases similares e não apresentar *gaps* (espaços entre as bases).

Para o cálculo deste valor o GenBank atribui valor 2 à coincidência entre o nucleotídeo de uma dada seqüência com a seqüência alvo, valor -2 se elas são diferentes e valor -5 se há necessidade da introdução de um *gap* para que haja o alinhamento do restante das seqüências. Bons alinhamentos terão o maior *score*. O *valor-e* mede a probabilidade de que o alinhamento entre o iniciador e a seqüência alvo tenha sido ao acaso. O melhor alinhamento possível é alcançado quando o *valor-e* é igual a zero, que significa que a possibilidade de que o alinhamento tenha

ocorrido ao acaso é nula. Um alinhamento é considerado significativo quando o *valor-e* é < -20 .

A eleição dos iniciadores também levou em consideração que do total de trabalhos analisados, 15 utilizaram os iniciadores escolhidos, desde o trabalho de Tachibana e colaboradores (1991), até mais recentemente Jiang e colaboradores (2008) (Quadro 3).

Zaman e colaboradores (2000) investigando a viabilidade da PCR para pesquisa da *E. histolytica* em material obtido de abscesso hepático, testou dez pares de iniciadores distintos. Com apenas três deles os resultados foram reprodutíveis, a saber: p1/p2, p11plus/p12plus e entf/entr, sendo a sensibilidade dos dois primeiros igual a 100% e do último 95%. Na análise *in silico* do presente estudo, os iniciadores p11plus/p12plus e entf/entr apresentaram bons resultados, entretanto o p1/p2 foi considerado inválido por alinhar-se com sequências de *E. dispar* formando amplicon de 66 pares de bases (Quadro 3). Desta forma, os iniciadores validados na bancada por Zaman e colaboradores (2000) foram também validados na análise virtual exceto p1/p2, corroborando parcialmente com os achados do presente trabalho.

Garcês & Lima (2004) utilizando análise *in silico* para o desenho e validação de iniciadores intragenéricos, de genes codificantes de hidrolases nos gêneros *Bacillus*, *Streptomyces* e *Escherichia* observou que esta estratégia pode facilitar a seleção de iniciadores com grande probabilidade do resultado ser reproduzido na bancada. De fato, a ferramenta utilizada para seleção dos iniciadores no presente estudo, se mostrou consistente com os dados obtidos posteriormente *in vitro*.

A análise *in silico* para orientar a busca de iniciadores, facilita o trabalho do pesquisador, uma vez que, é mais rápido e econômico que a análise laboratorial, e utiliza para sua execução programas de computador de acesso gratuito na Internet.

Quadro 3 – Análise por bioinformática dos iniciadores utilizados na detecção de *Entamoeba*, descritos na literatura no período de 1991-2008, com descrição da técnica, região alvo, seqüência dos iniciadores, quantidade de citosina e guanina (CG), amplicon e dados do GenBank.

Técnica	Região alvo	Iniciadores e %CG	amplicon (pb)	GenBank		
				SEQREF e comentário	escore	valor-e
PCR-Convencional TACHIBANA <i>et al.</i> , 1991 TACHIBANA <i>et al.</i> , 1992 RIVERA <i>et al.</i> , 1996 SANUKI <i>et al.</i> , 1997 RIVERA <i>et al.</i> , 1998 ZENGZHU <i>et al.</i> , 1999 MYJAK <i>et al.</i> , 2000 TACHIBANA <i>et al.</i> , 2000 ZAMAN <i>et al.</i> , 2000 TACHIBANA <i>et al.</i> , 2001 ZINDROU <i>et al.</i> , 2001 HAGHIGHI <i>et al.</i> , 2002 PINHEIRO <i>et al.</i> , 2004 RIVERA <i>et al.</i> , 2006 JIANG <i>et al.</i> , 2008.	Gene codificante de uma proteína 30-kDa antigênica	^a p11plus 5' GGAGGAGTAGGAAAAGTTGAC 3' sense CG=50.0% ^a p12plus 5' TTCTTGCAATTCCTGCTTCGA 3' antisense CG=42.9%	100	⚡ XM_001914604.1 ⚡ XM_001914570.1 ⚡ XM_647979.2 ⚡ XM_644379.2 ⚡ EU022309.1 ⚡ X70996.1 ⚡ D10512.1 ⚡ D00871.1 ⚡ M35635.1	40.1 42.1	0.041 0.016
		^b p13plus 5' AGGAGGAGTAGGAAAATTAGG 3' sense CG= 42.9% ^b p14plus 5' TTCTTGAAACTCCTGTTTCTAC 3' antisense CG=36.4%	101	☉ XM_001740812.1 ☉ XM_001738989.1 ☉ XM_001738704.1 ☉ XM_001738370.1 ☉ XM_001738351.1 ☉ XM_001737932.1 ☉ XM_001737799.1 ☉ D00872.1 ☉ AB026184.1 ☉ XM_001737278.1 ☉ XM_001737174.1 ☉ XM_001737144.1 ☉ XM_001736359.1 ☉ XM_001736301.1 ☉ XM_001735152.1 ☉ XM_001734937.1 ☉ XM_001734803.1 ☉ XM_001734803.1 ☉ XM_001734803.1 ☉ XM_001733877.1 ☉ XM_001733539.1	42.1 44.1	0.018 0.006
PCR-Convencional GONIN & TRUDEL 2003 CALDERARO <i>et al.</i> , 2006	SSU rRNA do Plasmidio epissomal	^a EH1 5' GTACAAAATGGCCAATTCATTCAATG 3' sense %CG=34.6 ^c EHD2: 5' ACTACCAACTGATTGATAGATCAG 3' antisense %CG=37.5	135	⚡ AB282658.1 ⚡ AB282659.1 ⚡ AB282660.1	52 48.1	4e-05 4e-04
		^b ED1 5' TACAAAGTGGCCAATTTATGTAAGTA 3' sense %CG=38.8 ^c EHD2: 5' ACTACCAACTGATTGATAGATCAG 3' antisense %CG=37.5		☉ AB282661.1 ☉ Z49256.1	52.0 48.1	4e-05 5e-04

a – específico para *E. histolytica*

b – específico para *E. dispar*

c – específico para *E. histolytica* e *E. dispar*

d – específico para *E. moshkovskii*

e – específico para *Entamoeba sp*

f – cada autor descreve um tamanho diferente do amplicon

⚡ Sequência do DNA da *E. histolytica*

☉ Sequência do DNA da *E. dispar*

● Sequência do DNA da *E. moshkovskii*

⚡ Sequência do DNA das espécie *E. nuttalli*, *E. ecuadoriensis* ou *E. terrapinae*

Φ Sequência do DNA de *Schistosoma mansoni*

☉ Sequência da espécie *Bos taurus*

Continuação: **Quadro 3**

Técnica	Região alvo	Iniciadores e %CG	amplicon (pb)	GenBank		
				SEQREF e comentário	escore	valor-e
PCR-NESTED EVANGELOPOULOS <i>et al.</i> , 2000 EVANGELOPOULOS <i>et al.</i> , 2001 PAGLIA & VISCO, 2004	SSU rDNA	^c E1 5' TGCTGTGATTAACGCT 3' sense CG=38.9% ^c E2 5' TTAAC TATTTC AATCTCGG 3' antisense CG=31.6%	1.076	Y11272.1 X64142.1 X65163.1 AB282660.1 AB282661.1 AB282659.1 AB282658.1 X56991.1 Z49256.1	40.1 42.1	0.041 0.016
		^a Eh-L 5' ACATTTTGAAGACTTTATGTAAGTA 3' sense CG=24.0% ^a Eh-R 5' CAGATCTAGAAACAATGCTTCTCT 3' antisense CG=37.5%	427	Y11272.1 X64142.1 X65163.1 AB282660.1 AB282659.1 AB282658.1 X56991.1	40.1 42.1	0.041 0.016
		^b Ed-L 5' GTTAGTTATCTAATTTTCGATTAGAA 3' sense CG=24% ^b Ed-R 5' ACACCACTTACTATCCCTACC 3' antisense CG=47.6%	195	AB282661.1 Z49256.1	36.2 42.1	0.73 0.018
PCR-NESTED MULTIPLEX KHAIRNAR & PARIJA 2007 PARIJA & KHAIRNAR 2007	SSU rDNA	^e E-1 5' TAAGATGCACGAGAGCGAAA 3' sense CG=45% ^e E-2 5' GTACAAAGGGCAGGGACGTA 3' antisense CG=55%	Autor não informa	FN362675.1 AB426549.1 AB282661.1 AB282660.1 AB282659.1 AB282658.1 AB197936.1 X65163.1 X64142.1 X56991.1 Z49256.1 AF149906.1 AB282657.1 DQ286373.1 AF149910.1	40.1 40.1	0.047 0.047
		^a EH-1 5' AAGCATTGTTTCTAGATCTGAG 3' sense CG=36.4% ^a EH-2 5' AAGAGGTCTAACCGAAATTAG 3' antisense CG=38.1%	439	AB282660.1 AB282659.1 AB282658.1 X56991.1 X64142.1 X65163.1	40.1 42.1	0.042 0.018
		^b ED-1 5' TCTAATTTTCGATTAGAACTCT 3' sense CG=28.6% ^b ED-2 5' TCCCTACCTATTAGACATAGC 3' antisense CG=42.9%	174	Z49256.1 AB282661.1	42.1 42.1	0.018 0.018
		^d Mos-1 5' GAAACCAAGAGTTTCACAAC 3' sense CG=40% ^d Mos-2 5' CAATATAAGGCTTGATGAT 3' antisense CG=35%	553	AF149906.1	40.1 40.1	0.047 0.047

a – específico para *E. histolytica*;
b – específico para *E. dispar*
c – específico para *E. histolytica* e *E. dispar*
d – específico para *E. moshkovskii*
e – específico para *Entamoeba sp*
f – cada autor descreve um tamanho diferente do amplicon

[X](#) Sequência do DNA da *E. histolytica*
[C](#) Sequência do DNA da *E. dispar*
[M](#) Sequência do DNA da *E. moshkovskii*
[S](#) Sequência do DNA das espécie *E. nuttalli*, *E. ecuadoriensis* ou *E. terrapinae*
[P](#) Sequência do DNA de *Schistosoma mansoni*
[B](#) Sequência da espécie *Bos taurus*

Continuação: **Quadro 3**

Técnica	Região alvo	Iniciadores e %CG	amplicon (pb)	GenBank		
				SEQREF e comentário	escore	valor-e
PCR-Convencional CLARK & DIAMOND 1993	Gene codificante de antígeno rico em serina (SREHP)	SREHP5: 5' GCTAGTCCTGAAAAGCTTGAAGAAGCTG 3' sense CG=46.4% SREHP3: 5' GGACTTGATGCAGCATCAAGGT 3' antisense CG=50%	550pb	☞ XM_643162.2 ☞ M34438.1 ☞ M80910.1 ☞ AB253474.1 ☞ AB253474.1 ☞ M75948.1	53.0 44.1	3e-06 0.005
PCR-Convencional CLARK, 1993 CLARK & DIAMOND 1992 RAMOS <i>et al.</i> , 1999 RAMOS <i>et al.</i> , 2005a	SSU rDNA	°RD5 5' ATCTGGTTGATCCTGCCAGT 3' sense CG=50.0% °RD3 5' ATCCTTCCGCAGGTTCACT 3' antisense CG=55.0%	1950	☺ AB282661.1 ☞ AB282660.1 ☞ AB282659.1 ☞ AB282658.1 ☼ AB282657.1 O autor afirma que a região não é específica. A região amplificada é conservada existindo em várias espécies com seqref depositadas no genbank.	40.1 40.1	0.047 0.047
PCR-NESTED AYEH-KUMI <i>et al.</i> , 2001 RAMOS <i>et al.</i> , 2005a	Autores não específica	^a SRPEh5 5' CCTGAAAAGCTTGAAGAAGCTG 3' sense CG=45.5% ^a SRPEh3 5' AACAATGAATGGACTTGATGCA 3' antisense CG=36.4%	^f 553/549	☞ XM_643162.2 ☞ AB253474.1 ☞ M34438.1 ☞ M80910.1	44.1 44.1	0.006 0.006
		^a nSRPEh5 5' TGAAGATAATGAAGATGATGAAGATG 3' sense CG=30.8% ^a nSRPEh3 5' TATTATTATCGTTATCTGAACTACTTCCTG 3' antisense CG=30.0%	^f 452/450	☞ XM_643162.2 ☞ AB253474.1 ☞ M34438.1 ☞ M80910.1	110 60.0	4e-05 3e-07
		^b SRPEd 5' GTAGTTCATCAAACACAGGTGA 3' sense CG=40.9% ^b SRPEd 5' CAATAGCCATAATGAAAGCAA 3' antisense CG=33.3%	567	☺ XM_001735589.1 ☺ M75949.1 (strain SAW142) ☺ M75950.1 (strain SAW142)	44.1 42.1	0.006 0.018
PCR- REAL TIME ROY <i>et al.</i> , 2005	SSU rDNA	^a Ehf : 5' AACAGTAATAGTTTCTTTGGTTAGTAAAA-3 sense CG=24.1% ^a Ehr : 5' CTTAGAATGTCATTTCTCAATTCAT-3 Antisense CG=28% Red- <u>GCGAGCATT</u> AGT ACA AAA TGG CCA ATT CAT TCA- <u>GCTCGC</u> -dR	134	☞ AB426549.1 ☞ AB282660.1 ☞ AB282659.1 ☞ AB282658.1 ☞ AB197936.1 ☞ X56991.1 ☞ Y11272.1 ☞ X65163.1 ☞ X65163.1 ☞ X61116.1 ☞ X75434.1 ☞ X64142.1	58.0 50.1	9e-07 1e-04

a – específico para *E. histolytica*

b – específico para *E. dispar*

c – específico para *E. histolytica* e *E. dispar*

d – específico para *E. moshkovskii*

e – específico para *Entamoeba sp*

☞ Sequência do DNA da *E. histolytica*

☺ Sequência do DNA da *E. dispar*

☼ Sequência do DNA da *E. moshkovskii*

☼ Sequência do DNA das espécie *E. nuttalli*, *E. ecuadoriensis* ou *E. terrapinae*

☐ Sequência do DNA de *Schistosoma mansoni*

Continuação: **Quadro 3**

Técnica	Região alvo	Iniciadores e %CG	amplicon (pb)	GenBank		
				SEQREF e comentário	escore	valor-e
PCR- REAL TIME VERWEIJ <i>et al.</i> , 2004	SSU rDNA	^a End-239F: 5' ATTGTCGTGGCCTCCTAACTCA 3' sense CG=45.5% ^a Ehd-88R: 5' GCGGACGGCTCATTATAACA 3' antisense CG=50.0% VIC-5_- TCATTGAATGAATTGGCCATTT -3_-nonfluorescent quencher	172	⌘AB282660.1 ⌘X56991.1 ⌘AB282659.1 ⌘Y11272.1 ⌘AB282658.1 ⌘X61116.1 ⌘AB282657.1 ⌘X75434.1 ⌘X64142.1 ⌘X64142.1	44.1 40.1	0.005 0.041
PCR -RFLP NOVATI <i>et al.</i> , 1996	SSU rDNA	^c Entf: 5' GGATTGGATGAAATTCAGATGT 3' sense CG=36.4% ^c Entr: 5' ATGTGTCCCTTTAAGAAGTGGT 3' antisense CG=40.9% Enzima <i>DdeI</i> = (CTNAG/GANTC) <i>E. histolytica</i> =240pb, 130pb e 50pb. <i>E. dispar</i> 290pb e 130pb.	420	⌘AB426549.1 ☉AB282661.1 ⌘AB282660.1 ⌘AB282659.1 ⌘AB282658.1 ⌘AB197936.1 ☉Z49256.1 ⌘X56991.1 ⌘Y11272.1 ⌘X89636.1 ⌘X65163.1 ⌘X64142.1 ⌘X61116.1	44.1 44.1	0.005 0.005
PCR-Convencional FREITAS <i>et al.</i> , 2003	Gene cysteina proteinase 5 (EhCP5)	^a EhCP6F: 5' GTTGCTGCTGAAGAACTTG 3' sense CG=45% ^a EhCP6R: 5' GTACCATAACCAACTACTGC 3' antisense CG=45%	242	⌘XM_645845.2 DQ899179.1 ⌘DQ899178.1 ⌘X91644.2	40.1 40.1	0.047 0.047
PCR-Convencional FREITAS <i>et al.</i> , 2003	Gene Actina (Act3)	^c Act3: 5' GGGACGATATGGAAAAGATC 3' sense CG=45% ^c Act5: 5' CAAGTCTAAGAATAGCATGTG 3' antisense CG=38.1%	300	⌘XM_650398.2 ⌘XM_650064.2 ⌘XM_001913751.1 ⌘XM_651646.2 ⌘AY956428.2 ⌘M16339.1 ⌘M19871.1 ⌘M16396.1 ⌘M16396.1 ⌘M16341.1 ⌘M16341.1 ⌘M16340.1 Os iniciadores alinham-se apenas seqref da <i>E. histolytica</i>	40.1 42.1	0.047 0.018

a – específico para *E. histolytica*

b – específico para *E. dispar*

c – específico para *E. histolytica* e *E. dispar*

d – específico para *E. moshkovskii*

e – específico para *Entamoeba sp*

f – cada autor descreve um tamanho diferente do amplicon

⌘ Sequência do DNA da *E. histolytica*

☉ Sequência do DNA da *E. dispar*

⦿ Sequência do DNA da *E. moshkovskii*

☼ Sequência do DNA das espécie *E. nuttalli*, *E. ecuadoriensis* ou *E. terrapinae*

Φ Sequência do DNA de *Schistosoma mansoni*

☺ Sequência da espécie *Bos taurus*

Continuação: **Quadro 3**

Técnica	Região alvo	Iniciadores e %CG	amplicon (pb)	GenBank		
				SEQREF e comentário	escor e	valor-e
<p>PCR –RFLP</p> <p>HOOSHYAR <i>et al.</i>, 2004</p>	<p>Gene codificante de proteína com 30-kDa antigênica</p>	<p>°HF: 5' AAGAAATTGATATTAATGAATATA 3' sense CG=12.5%</p> <p>°HR: 5' ATCTTCCAATCCATCATCAT 3' antisense CG=33.3%</p> <p>Enzima hinfI = GANTC</p> <p><i>E. histolytica</i> =155pb e 219pb.</p> <p><i>E. dispar</i> =67, 152 e 155pb.</p>	<p>374</p>	<p>©XM_001739661.1©XM_001738989.1 ©XM_001738704.1©XM_001738351.1 ©XM_001737932.1©XM_001737799.1 ©XM_001737278.1©XM_001737174.1 ©XM_001737144.1©XM_001736359.1 ©XM_001735152.1©XM_001734937.1 ©XM_001734803.1©XM_001734185.1 ©XM_001733877.1©XM_001733539.1 ☼D00872.1©AB026184.1</p> <p>A análise da RFLP virtual concluiu a formação de um único padrão com 3 fragmentos (67, 152, 155pb), nas seqüências da <i>E. histolytica</i> e <i>E. dispar</i>. Não distinguindo as espécies.</p>	<p>48.1 42.1</p>	<p>4e-04 0.016</p>
<p>PCR –MULTIPLEX</p> <p>NUNES <i>et al.</i>, 2001 SANTOS <i>et al.</i>, 2007</p>	<p>Tandem no DNA circular extra-cromossomal</p>	<p>^aEHP1: 5' CGATTTTCCCAGTAGAAATTA 3' sense CG=33.3%</p> <p>^aHR2: 5' CAAAATGGTCGTCTAGGC 3' antisense CG=50.0%</p>	<p>132</p>	<p>Ausência de alinhamento com o genoma, como também não foi detectado nenhuma alinhamento com seqüência depositada por outros pesquisadores.</p>		
		<p>^bEdP1 5' ATGGTGAGGTTGTAGCAGAGA 3' sense CG=47.6</p> <p>^bEdP2 5' CGATATTGGATACCTAGTACT 3' antisense CG=38.1%</p>	<p>96</p>			

a – específico para *E. histolytica*

b – específico para *E. dispar*

c – específico para *E. histolytica* e *E. dispar*

d – específico para *E. moshkovskii*

e – específico para *Entamoeba sp*

f – cada autor descreve um tamanho diferente do amplicon

☼ Sequência do DNA da *E. histolytica*

© Sequência do DNA da *E. dispar*

● Sequência do DNA da *E. moshkovskii*

☼ Sequência do DNA das espécie *E. nuttalli*, *E. ecuadoriensis* ou *E. terrapinae*

Φ Sequência do DNA de *Schistosoma mansoni*

☺ Sequência da espécie *Bos taurus*

Continuação: **Quadro 3**

Técnica	Região alvo	Iniciadores e %CG	amplicon (pb)	GenBank		
				SEQREF e comentário	escor e	valor-e
PCR-Convencional CLARK & DIAMOND 1991 MYJAK <i>et al.</i> , 1997 MYJAK <i>et al.</i> , 2000 RAMOS <i>et al.</i> , 2000 LEBBAD & SVARD 2005 MORAN <i>et al.</i> , 2005a MORAN <i>et al.</i> , 2005b RAMOS <i>et al.</i> , 2005a LEIVA <i>et al.</i> , 2006	SSU rDNA	^a Psp5 5' GGCCAATTCATTCAATGAATTGAG 3' sense CG=37.5% ^a Psp3 5' CTCAGATCTAGAAACAATGCTTCTC 3' antisense CG=40.0%	~876	Ⓞ FN362675.1 Ⓢ X56991.1 Ⓢ X64142.1 Ⓢ X65163.1 Ⓢ AB282658.1 Ⓢ AB282659.1 Ⓢ AB282660.1 Ocorre alinhamento com seqref de <i>S. mansoni</i> .	78.3 50.1	5e-04 1e-04
		^b NPspF 5' GGCCAATTTATGTAAGTAAATTGAG 3' sense CG=32.0% ^b NPspR 5' CTTGGATTTAGAAACAATGTTTCTTC 3' antisense CG=30.8%		☺ AB282661.1 ☺ Z49256.1	50.1 52.0	1e-04 4e-05
PCR-Convencional ROMERO <i>et al.</i> , 1992	DNA de seqüência altamente repetida	^a EHP1 5' TCAAAATGGTCGTCGTCTAGGC 3' sense CG=50.0% ^a EHP2 5' CAGTTAGAAATTATTGACTTTGTA 3' antisense CG=24.0%	151	Ⓢ X75434.1 ☺ AJ306927.1 Alinhamento com 66pb em cada seqref	44.1 50.1	0.006 1e-04
		^b EHNP1 5' GGATCCTCCAAAAATAAAGT 3' sense CG=33.3% ^b EHNP2 5' CCACAGAACGATATTGGATACC 3' antisense CG=45.5%		Ⓞ FN362675.1 Alinhamento com 66pb da seqref de <i>S. mansoni</i> .	381 678	0.006 1e-04
		^b EHNP1 5' GGATCCTCCAAAAATAAAGT 3' sense CG=33.3% ^b EHNP2 5' CCACAGAACGATATTGGATACC 3' antisense CG=45.5%		Ⓞ FN365001.1 Alinhamento com 66pb da seqref de <i>S. mansoni</i> .	72.4 100	0.006 1e-04
		^b EHNP1 5' GGATCCTCCAAAAATAAAGT 3' sense CG=33.3% ^b EHNP2 5' CCACAGAACGATATTGGATACC 3' antisense CG=45.5%	133	Ausência de alinhamento		

a – específico para *E. histolytica*
 b – específico para *E. dispar*
 c – específico para *E. histolytica* e *E. dispar*
 d – específico para *E. moshkovskii*
 e – específico para *Entamoeba sp*
 f – cada autor descreve um tamanho diferente do amplicon

Ⓢ Sequência do DNA da *E. histolytica*
 ☺ Sequência do DNA da *E. dispar*
 ● Sequência do DNA da *E. moshkovskii*
 ⚙ Sequência do DNA das espécie *E. nuttalli*, *E. ecuadoriensis* ou *E. terrapinae*
 Ⓞ Sequência do DNA de *Schistosoma mansoni*
 ☹ Sequência da espécie *Bos taurus*

Continuação: **Quadro 3**

Técnica	Região alvo	Iniciadores e %CG	amplicon (pb)	GenBank		
				SEQREF e comentário	escor e	valor-e
PCR-Convencional ACUNA-SOTO <i>et al.</i> , 1993 AGUIERRE <i>et al.</i> , 1995 BRITTEN <i>et al.</i> 1997 VERWEIJ <i>et al.</i> , 2000	Tandem no DNA circular extra-cromossomal	^a Eh1 ou P1: 5' TCAAATGGTCGTCGTCCTAGGC 3' sense CG=50.0% ^a Eh2 ou P2: 5' CAGTTAGAAATTATTGTACTTTGTA 3' antisense CG=24.0%	125	©AJ3069.1 Alinhamento com 66pb da seqref de <i>E. dispar</i> .	44.1 100	0.005 1e-05
				©X74960.1 Alinhamento com 66pb da seqref de <i>Bos taurus</i> .	44.1 50.1	0.005 1e-05
				⚡EU022309.1 ⚡X70996.1 ⚡D10512.1 ⚡D00871.1 ⚡M35635.1	40.1 42.1	0.041 0.016
PCR-Convencional CLARK & DIAMOND 1993	Gene SSG	^a SSG5: 5' GGTCTCAAAAAACCCACGAG 3' sense CG=50% ^a SSG3: 5' CAAACGATAAAATCTAGCAAACACTAC 3' antisense CG=32%	400	⚡X75434.1 ⚡M84216.1 ⚡M60017.1 O tamanho do amplicon o foi de 649pb (249pb acima do indicado pelo autores)	40.1 50.1	0.041 1e-04
PCR- REAL TIME CALDERARO <i>et al.</i> , 2006 BLESSMANN <i>et al.</i> , 2002	SSU rDNA	^a Eh-S26C: 5' GTACAAAATGGCCAATTCATTCAACG- 3' sense CG=38.5 % ^a Eh/Ed-AS25: 5' GAATTGATTTACTCAACTCTAGAG-3' antisense CG= 32%	310	Ausência de alinhamento Problemas na cadeia sense com ausência no início das bases TA e pela presença das bases CG no final.		
PCR-NESTED AYEY-KUMI <i>et al.</i> , 2001 HAQUE <i>et al.</i> , 1998 KATZWINKEL-WLADARSCH <i>et al.</i> , 1994	SSU rDNA	^c E1 5' TTTGTATTAGTACAAA 3' sense CG=24% ^c E2 5' GTA(A/G)TATTGATATACT 3' antisense CG=G25% ou A18.0%	900	⚡AB426549.1 ⚡AB282660.1 ⚡AB282659.1 ⚡AB282658.1 ⚡FN362675.1 ©AB282661.1 ©Z49256.1	40.1 40.1	0.047 0.047
		^a EH1 5' AATGGCCAATTCATTCAATG 3' sense CG=35.0% ^a EH2 5' TTTAGAAACAATGCTTCTCT 3' antisense CG=30.0%		Ausência de alinhamento na segunda etapa da PCR-NESTED		
		^b ED1 5' AGTGGCCAATTTATGTAAGT 3' sense CG=35.0% ^b ED2 5' TTTAGAAACAATGTTTCTTC 3' antisense CG=25.0%		©AB282661.1 ©Z49256.1	40.1 40.1	0.047 0.047

a – específico para *E. histolytica*
 b – específico para *E. dispar*
 c – específico para *E. histolytica* e *E. dispar*
 d – específico para *E. moshkovskii*
 e – específico para *Entamoeba sp*
 f – cada autor descreve um tamanho diferente do amplicon

⚡ Sequência do DNA da *E. histolytica*
 © Sequência do DNA da *E. dispar*
 ● Sequência do DNA da *E. moshkovskii*
 ⚡ Sequência do DNA das espécie *E. nuttalli*, *E. ecuadoriensis* ou *E. terrapinae*
 ⚡ Sequência do DNA de *Schistosoma mansoni*
 © Sequência da espécie *Bos taurus*

5.5.2. Padronização da PCR

A detecção e a diferenciação da *E. histolytica* e da *E. dispar* a partir de cultivo *in vitro* do material fecal, demandam maior tempo e custo, e requerem profissionais capacitados para execução da técnica e identificação dos trofozoítos. Porém os parasitos obtidos de cultivo são mais adequados como fonte de material para a execução da técnica da PCR, devido à menor quantidade de contaminantes que poderiam inibir a reação, e maior concentração de DNA alvo (LANTZ *et al.*, 1997; HOOSHYAR *et al.*, 2004).

O desafio do presente trabalho foi amplificar amostras de DNA extraído diretamente de fezes sem conservante, sem o cultivo prévio do parasito, com a finalidade de padronizar um método de relativamente fácil execução, menor custo e tempo.

Um dos fatores críticos para êxito da PCR é a extração do DNA das fezes. Os melhores resultados têm sido obtidos pela utilização de *kits* de extração, sendo o *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (Quiagen®) amplamente utilizado para este fim (EVANGELOPOULOS *et al.*, 2000, 2001; FREITAS *et al.*, 2004; GONIN & TRUDEL, 2003; HECKENDORN *et al.*, 2002; PAGLIA & VISCA, 2004; VERWEIJ *et al.*, 2000). No presente estudo foi utilizado o *kit Stool PSP* (Invitek®), de menor custo e que apresentou resultados semelhantes ao *QIAamp* (dados não mostrados).

O desempenho da técnica foi avaliado variando-se a quantidade de iniciadores. Foram testadas as concentrações de 10pm e 20pm, como descrito por Pinheiro e colaboradores (2004) e Rivera e colaboradores (1996), respectivamente. Não foi observada diferença na PCR realizada com estas diferentes concentrações de iniciadores no caso da *E. histolytica*. Para *E. díspar*, aparentemente, a concentração de 20pm apresentou melhor resultado (Figura 11).

Para estudar a especificidade da PCR foram avaliadas amostras de fezes positivas pela microscopia para outros parasitos como *Ascaris lumbricoides*, *Trichures trichiura*, *Ancylostomatidae*, *Strongyloides stercoralis*, *Enterobius vermicularis*, *Schistosoma mansoni*, *Hymenolepis nana*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba coli* e *Endolimax nana*. Não houve amplificação do DNA em nenhuma dessas amostras, tanto frente a iniciadores desenhados para *E. histolytica* (p11plus/p12plus) como para *E. dispar* (p13plus/p14plus) (Figura 12). A especificidade foi igualmente testada para verificar se os iniciadores desenhados para *E. histolytica* amplificavam

fragmentos gênicos da *E. dispar* e vice-versa. Ambos os iniciadores foram espécie específicos não havendo formação de amplicons em nenhuma das situações (Figura 13). Este achado corrobora com os resultados da análise virtual dos iniciadores.

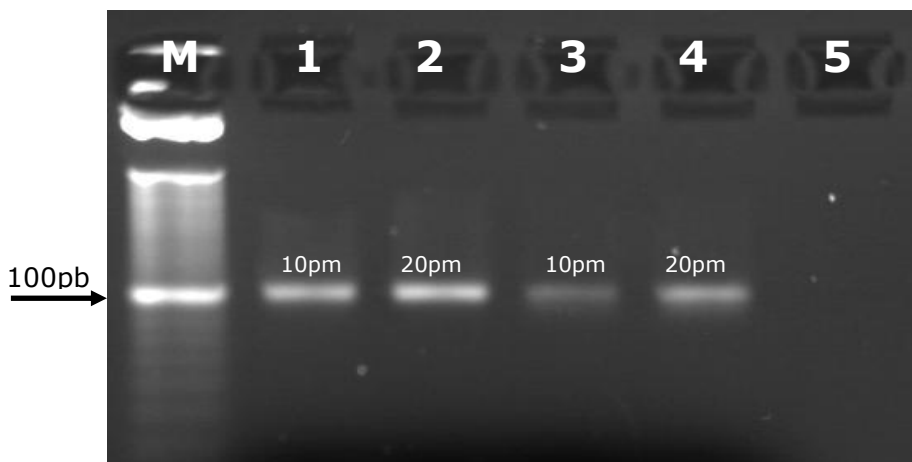


Figura 11 – Gel de Agarose 3%. Poço M: Marcador de peso molecular de 20pb (Invitrogen®); Poços 1 e 2: amplicom da *E. histolytica* (100pb) com 10pm e 20pm, respectivamente; Poços 3 e 4: amplicom da *E. dispar* (101pb) 10pm e 20pm, respectivamente; Poço 05: Controle negativo para ambas as espécies.

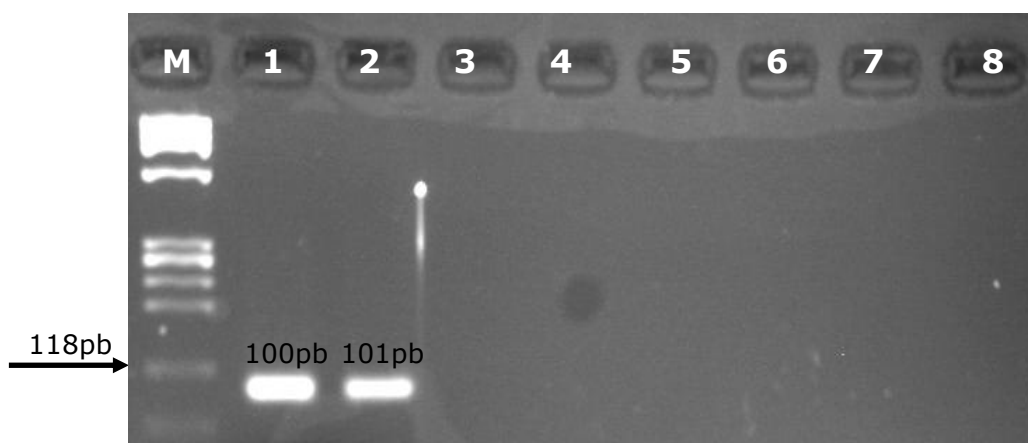


Figura 12 – Gel de Agarose 3%. Poço M: Marcador de peso molecular ϕ X 174 RF (Promega®); Poços 1 e 2: Controle positivo *E. histolytica* (100pb) e *E. dispar* (101pb), respectivamente; Poços 3 à 7 amostras de fezes positivas para diferentes espécies de parasitos; Poço 3: *Ascaris lumbricoides*, *Trichures trichiura*; Poço 4: Ancylostomatidae, *Strongyloides stercoralis*; Poço 5: *Enterobius vermicularis*, *Schistosoma mansoni* Poço 6: *Hymenolepis nana*, *Giardia lamblia* ; Poço 7: *Entamoeba coli* e *Endolimax*; Poço 8: Controle negativo para ambas as espécies.

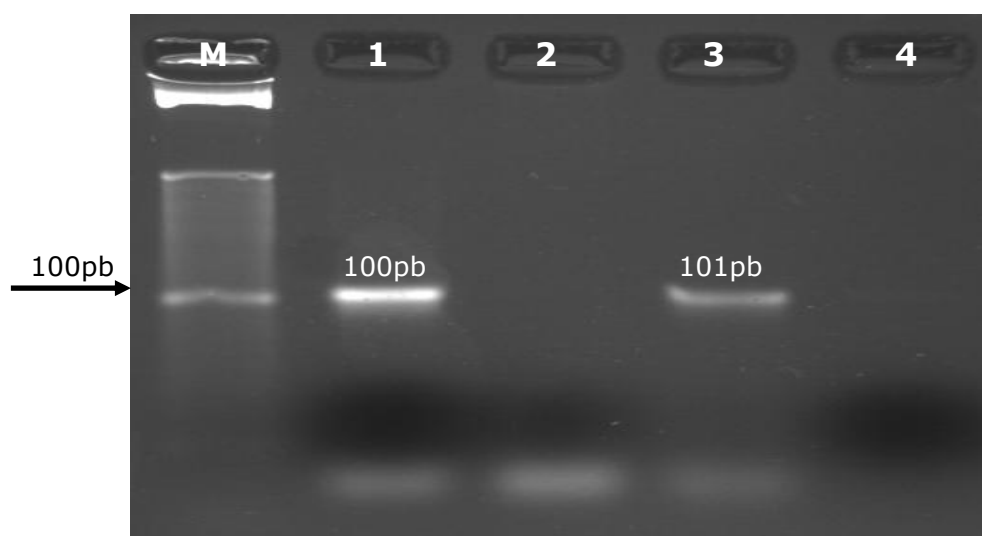


Figura 13 – Gel de Agarose 3%. Poço M: Marcador de peso molecular de 20pb (Invitrogen®); Poços 1 e 3: Controle positivo da *E. histolytica* (100pb) e *E. dispar* (101pb), respectivamente; Poço 2: amostra com DNA da *E. dispar* amplificado com iniciadores para *E. histolytica*; Poço 4: amostra com DNA da *E. histolytica* amplificado com iniciadores para *E. dispar*.

No presente estudo não foi realizado o teste de sensibilidade para determinação da quantidade mínima DNA extraído de cistos de *Entamoeba* detectado pela PCR. Os resultados de Rivera e colaboradores (1996) sugerem uma boa sensibilidade da PCR, com a detecção de no mínimo cinco cistos com os iniciadores p11plus/p12plus e p13plus/p14plus.

A reprodutibilidade foi avaliada durante os experimentos da padronização, realizados sempre em duplicata, não existindo nenhuma discordância nos resultados. Após a padronização iniciou-se a avaliação nas amostras dos escolares.

5.5.3. Prevalência da *Entamoeba histolytica* e *E. dispar* pela PCR.

Das 64 amostras positivas à microscopia para o complexo *E. histolytica/E. dispar* submetidas à PCR, 1,4% (14/1.003) foi positiva somente para *E. histolytica* e 3,6% (36/1.003) para *E. dispar*. A prevalência de infecção por ambas as espécies foi de 1,4% (14/1.003) (Tabela 7). Considerando os pacientes mono e co-infectados pelas duas espécies de *Entamoeba*, a prevalência de amebíase nos escolares foi igual a 2,8% (28/1003), e da *E. dispar* foi de 5,0% (50/1.003), sendo significativa a

diferença entre as proporções ($p < 0,05$). A ocorrência de *E. dispar* foi 4,6 vezes maior que a *E. histolytica* [OR: 4,6 (IC95%: 1,9 – 10,7) $p < 0,01$; χ^2 : 14,47].

Tabela 7 – Prevalência da *E. histolytica* e *E. dispar* através da PCR nos escolares da rede pública da cidade de Maceió-AL.

Espécies Identificadas	PCR	
	n	%
<i>E. histolytica</i>	14	1,4
<i>E. dispar</i>	36	3,6
<i>E. histolytica</i> e <i>E. dispar</i>	14	1,4
Total	64*	6,4

*Amostras positivas à microscopia ótica para o complexo *E. histolytica*/*E. dispar*

A prevalência de amebíase é extremamente variável no mundo. Na Nicarágua, em um trabalho que avaliou amostras de 134 indivíduos com diarreia, foram encontrados 6% de casos de infecção pelo complexo *E. histolytica*/*E. dispar*. Quando submetidas à PCR, a *E. histolytica* foi diagnosticada em dois (1,5%) indivíduos e a *E. dispar* em dez (7,5%) pacientes (LEIVA *et al.*, 2006). No entanto, em outros locais há relatos da ocorrência de amebíase bem superiores ao observado no presente inquérito. Em uma comunidade rural do México, utilizando a PCR como método diagnóstico, foram observadas prevalências de 13,8% e 9,6% para *E. histolytica* e *E. dispar*, respectivamente (RAMOS *et al.*, 2005b). Na Austrália, o exame laboratorial pela PCR de amostras de pacientes com diarreia, detectou 5% de pacientes com infecção pela *E. histolytica*, 70,8% pela *E. dispar* e 61,8% pela *E. moshkovskii* (FOTEDAR *et al.*, 2007b).

No Brasil, há ainda uma carência de dados epidemiológicos baseados na PCR relativos à ocorrência da amebíase. No Rio de Janeiro, foram avaliados 127 amostras de fezes de duas comunidades pela PCR-Multiplex e ELISA, sendo observado 7,1% de amostras com *E. dispar* e 1,6% de casos de *E. histolytica*, indicando a presença da amebíase na região investigada (SANTOS *et al.*, 2007). Em João Pessoa, Paraíba, a *E. histolytica*, foi diagnosticada em 5,8% dos casos de diarreia (MORENO *et al.*, 2010). Estes dados contrastam com trabalhos conduzidos em Pernambuco, estado no qual não foi detectado, até o presente, nenhum caso de infecção pela *E. histolytica* (PINHEIRO *et al.*, 2004), sendo de fundamental

importância a realização de inquéritos para determinar o perfil epidemiológico da amebíase em todo o território brasileiro. No entanto, a necessidade de profissionais qualificados e o custo elevado tanto dos reagentes como dos equipamentos necessários para o procedimento, limitam o uso desta técnica (HUSTON & PETRI, 1999).

5.6. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO - ELISA

5.6.1. Prevalência da *Entamoeba histolytica* pelo ELISA

Dos 1.003 examinados, foram identificados 30 casos (3,0%) de amebíase pela pesquisa de coproantígeno pelo ELISA (Figura14). A média de idade dos escolares com o parasito foi de $10 \pm 6,8$ anos (Tabela 8). Observou-se uma maior percentagem de infectados no grupo de 12-15 anos (3,9%). No entanto, comparando-se com os demais grupos etários não houve significância estatística ($p < 0,05$).

Tabela 8 – Prevalência da amebíase de acordo com faixa etária nos escolares da rede pública da cidade de Maceió-AL.

Faixa etária (anos)	n	Diagnóstico		
		Microscopia*	ELISA**	PCR
4-7	239	13 (5,4%)	8 (3,3%)	8 (3,3%)
8-11	508	35 (6,9%)	12 (2,4%)	10 (2,0%)
12-15	256	16 (6,3%)	10 (3,9%)	10 (3,9%)
Total	1.003	64 (6,4%)	30 (3,0%)	28 (2,8%)

*Detecção pela microscopia de cistos do complexo *E. histolytica/E. dispar*

** Detecção do antígeno da *E. histolytica* pelo ELISA

O presente resultado é consistente com outros estudos epidemiológicos que indicam igualmente que o risco de transmissão independe da idade (PÓVOA *et al.*, 2000; RIVERO *et al.*, 2009). No entanto, na literatura existem relatos controversos que correlacionam prevalência e faixa etária. Foi observada maior freqüência da infecção em indivíduos de 6 a 14 anos (PEREZ *et al.*, 1997; BRAGA *et al.*, 1996), contrastando com dados que indicam maior número de casos de amebíase em pacientes acima de 16 anos (KOBAYASHI *et al.*, 1995). Por sua vez, Rivera e colaboradores (1996) nas Filipinas, trabalhando com faixas etárias mais amplas, observaram maior prevalência de amebíase na faixa etária de 5-14 anos, com

redução da prevalência da infecção coincidindo com o aumento da idade. Os autores sugerem a diminuição da exposição às fontes de infecção na idade adulta, associada ao um conhecimento acerca das formas de transmissão. Outra hipótese é o desenvolvimento de um certo grau de imunidade protetora contra a *E. histolytica* após anos consecutivos de exposição ao parasito.

Os casos de amebíase em Maceió foram identificados em estudantes de 11 das 16 escolas visitadas, oriundos de 16 bairros da cidade (Figura 15). Nenhum dos casos positivos pelo ELISA viajou para outro estado nos últimos seis meses, sugerindo a autoctonia dos casos identificados.

O ensaio imunoenzimático tem sido eleito como método de escolha para pesquisa de antígeno de *E. histolytica* em diferentes áreas endêmicas no mundo (HAQUE *et al.*, 1995, 1997, 1998; ABD-ALLA *et al.*, 2002; SAMIE *et al.*, 2006).

No Brasil, inquéritos baseados na pesquisa de coproantígenos específicos para *E. histolytica* tem sido realizados para detectar a ocorrência de amebíase no país. Em Pernambuco, a aplicação dos métodos de análise isoenzimática, reação em cadeia de polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) não detectaram a presença da *E. histolytica*, apenas da *E. dispar* (ACA *et al.*, 1994; PINHEIRO *et al.*, 2004; DOURADO *et al.*, 2006). Vale ressaltar, que o fluxo migratório entre a população de Pernambuco e Alagoas é grande, evidenciando a necessidade de medidas de controle e monitoramento da endemia em Maceió-AL. Tomé & Tavares (2007), a exemplo do que relatado para Pernambuco, não detectaram casos de amebíase entre 262 indivíduos amostrados do município de São Leopoldo, no Rio Grande do Sul. Em Fortaleza, Braga e colaboradores (1998) detectaram 10,6% de prevalência para amebíase pelo método de ELISA. Três anos depois, Braga e colaboradores (2001), utilizando o mesmo método, detectaram 14,9% de prevalência da infecção causada pela *E. histolytica*.

No Brasil, até o momento, a situação é mais grave na região norte do país. Em Belém-Pará, Póvoa e colaboradores (2000) observaram uma positividade para *E. histolytica* pelo ELISA de 29%. Posteriormente Silva e colaboradores (2005), utilizando mesmo método detectaram positividade semelhante (29,4%), considerando a amebíase como sério problema de saúde pública da região metropolitana da cidade. Em Manaus-Amazonas, a prevalência da infecção foi de 6,8%, sendo identificados os seguintes fatores de risco: local de residência, idade,

5.7. COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS PARA O DIAGNÓSTICO DA AMEBÍASE.

5.7.1. Microscopia ótica versus ELISA e PCR

Para determinar a eficácia da microscopia ótica no diagnóstico específico para amebíase foi calculado o valor preditivo positivo (VPP) utilizando como padrão-ouro a PCR e o ELISA. O resultado do VPP foi de 46,87% e 43,75% para o ELISA e a PCR respectivamente, não havendo diferença estatística entre estes valores ($p > 0,05$) (Figura 16). Não foi calculado o valor preditivo negativo uma vez que não foi feito o estudo das amostras negativas.

Este resultado não é de todo surpreendente, pois vários autores verificaram uma baixa eficiência (VPP) da microscopia para detecção dos casos verdadeiramente positivos de amebíase quando comparado a métodos específicos.

Nesbitt e colaboradores (2004), na Tanzânia, detectaram 1% de prevalência para *E. histolytica* e VPP de 43% pela microscopia utilizando o ELISA, resultado este, semelhante ao observado no presente estudo. Duarte (2006) avaliando 1.798 escolares de Maceió-AL constatou 26,4% de VPP para microscopia utilizando como referência o ELISA. Pillai e colaboradores, (1999) avaliando 112 pacientes do grupo de risco para amebíase (imigrantes de áreas endêmicas, homossexuais masculinos e viajantes dos últimos seis meses para área endêmica) detectaram baixa sensibilidade e VPP para a microscopia (70,4% e 27,3%, respectivamente) em relação à pesquisa de antígeno.

Na Arábia Saudita, foram avaliadas 186 amostras fecais pela microscopia e pesquisa de antígeno (ELISA). A microscopia identificou 31,3% de amostras com cistos do complexo *E. histolytica/E. dispar*, com confirmação da presença da *E. histolytica* em apenas cinco dos pacientes, demonstrando a necessidade da utilização de técnicas específicas para o diagnóstico da amebíase (BARNAWI *et al.*, 2007).

Diversas pesquisas confirmam que o diagnóstico pela microscopia ótica é responsável pelo diagnóstico de falso-positivos para a amebíase. Além da impossibilidade de diferenciar a *E. histolytica* da *E. dispar*, o microscopista pode confundir a *E. histolytica* com outras espécies de *Entamoeba* que colonizam o intestino grosso (PILLAI *et al.*, 1999; TANYUKSEL e PETRI, 2003 DOGANCI *et al.*, 2004).

Técnicas mais eficientes que permitam a diferenciação devem ser executadas e desenvolvidas, a fim de evitar o tratamento desnecessário quando somente a *E. dispar* está presente, como recomendado pela Organização Mundial de Saúde/Organização Pan-Americana de Saúde (OMS/OPS/UNESCO, 1997).

$\text{VPP} = \frac{30 \text{ (ELISA)} \times 100}{64} = 46,87\%$	$\text{VPP} = \frac{28 \text{ (PCR)} \times 100}{64} = 43,75\%$
---	---

Figura 16 – Determinação do valor preditivo positivo da microscopia óptica em relação a métodos específicos como: ELISA e PCR.

5.7.2. ELISA versus PCR

O ensaio imunoenzimático para detecção de antígeno do parasito foi utilizado como padrão-ouro. É uma técnica já padronizada, disponível comercialmente e apresenta, segundo a literatura, sensibilidade e especificidade superiores a 85%. Além disso, não necessita de profissionais com alto grau de treinamento devido à simplicidade de sua execução (GONZALEZ-RUIZ *et al.*, 1994b).

Haque e colaboradores (1998) detectaram uma correlação de 94% do ELISA com a PCR e análise isoenzimática, sugerindo o ELISA como uma boa ferramenta para inquéritos epidemiológicos. Gonin & Trudel (2003) encontraram menor sensibilidade do ELISA para diagnóstico específico da infecção por *Entamoeba* em relação a PCR, no entanto o índice de concordância foi considerado satisfatório ($Kappa=0,66$).

No presente estudo, a sensibilidade e especificidade da PCR frente ao ELISA foram de 93,3% e 100%, respectivamente, apresentando índice de concordância considerado excelente ($Kappa=0,96$) (Tabela 8 e Figura 17). A sensibilidade da PCR foi elevada (93,3%), sendo equivalente a PCR padronizada por Nuñez e colaboradores (2001). Estes autores obtiveram 94% de sensibilidade quando realizaram PCR-Multiplex em amostras de fezes. A alta especificidade da técnica

reflete os dados da literatura (VERWEIJ *et al.*, 2000, 2004; BLESSMANN *et al.*, 2002; NUNES *et al.*, 2001) (Figura 17).

Tabela 8 – Comparação do resultado do Ensaio Imunoenzimático com a Reação em Cadeia da Polimerase em 64 amostras de fezes positivas na microscopia em escolares da rede pública de ensino da cidade de Maceió-AL.

PCR	Ensaio Imunoenzimático		
	Positiva	Negativa	Total
Positivo	28	0	28
Negativo	2	34	36
Total	30	34	64

$$\text{Sensibilidade} = \frac{28 \times 100}{28 + 2} = 93,3\%$$

$$\text{Especificidade} = \frac{34 \times 100}{34 + 0} = 100\%$$

$$\text{VPN} = \frac{34 \times 100}{2 + 34} = 94,4\%$$

$$\text{VPP} = \frac{28 \times 100}{28 + 0} = 100\%$$

Figura 17 – Avaliação da sensibilidade, sensibilidade, valor preditivo positivo e negativo da PCR versus ELISA.

Vários fatores podem contribuir para a obtenção de resultados falso negativos pela PCR. A amplificação do DNA pode ser limitada pela presença de substâncias capazes de degradar DNA, tais como conservantes. Todas as amostras analisadas no presente trabalho foram coletadas e armazenadas sem substâncias tais como formol, o conservante mais utilizado para transporte e preservação das fezes. No entanto, Lebbad & Svard, (2005) avaliando amostras fecais pela PCR em paralelo, com e sem conservante, constataram que a presença de conservante não inibiu a reação. Os autores sugerem que o tempo de exposição da amostra a temperatura

ambiente é o principal fator que pode provocar uma rápida degradação do DNA do parasito.

Outro aspecto de que pode afetar a reação de amplificação é a presença de inibidores da atividade enzimática da *Taq* polimerase. As fezes apresentam maior complexidade quando utilizadas no diagnóstico molecular, devido à dificuldade de purificação do DNA. A abundância de substâncias inibidoras da amplificação pode gerar resultados falsos negativos (WILDE *et al.*, 1990; LANTZ *et al.*, 1997; MONTEIRO *et al.*, 1997; OIKARINEN *et al.*, 2009). No *kit* utilizado para extração do DNA das fezes dos escolares, havia um tratamento específico para retirada de impurezas que pudessem interferir na reação.

É provável que o tempo de armazenamento das fezes entre a coleta e execução da técnica (15 meses), tenha comprometido a amplificação da sequência alvo de alguma amostra fecal, pois durante este período pode ter ocorrido degradação de parte do DNA.

Quando se compara o ELISA (pesquisa de antígeno) versus a PCR para o diagnóstico específico na rotina dos laboratórios de análise clínicas, o primeiro apresenta mais vantagens devido ao menor custo e tempo de execução, dispensa de treinamento específico do laboratorista, e por ser um método mais simples de ser executado se comparado à PCR.

Verweij e colaboradores (2004) utilizando a PCR em tempo real – Multiplex, obtiveram excelente sensibilidade e especificidade quando comparado à microscopia óptica, comprovando a baixa eficiência da microscopia na detecção dos verdadeiros positivos e negativos. Entretanto o custo, a necessidade de equipamentos especiais e a complexidade de execução da técnica aumentam consideravelmente o valor da pesquisa do parasito em fezes.

A popularização da PCR para diagnóstico laboratorial de diferentes enfermidades infecciosas e não infecciosas, é promissora. Com redução dos custos dos reagentes e equipamentos, e ampliação do número profissionais capacitados tem proporcionado a utilização da PCR não apenas nos laboratórios de pesquisa, mas também nos setores públicos e privados. Vale ressaltar que, no caso específico da amebíase, a PCR é a única técnica capaz de identificar infecções mistas realçando sua importância como ferramenta em inquéritos epidemiológicos (HUSTON *et al.*, 1999).

Vários autores sugerem que tanto a detecção de antígeno pelo ELISA, como a amplificação específica de fragmentos gênicos pela PCR, são adequados para o diagnóstico específico para amebíase. A escolha do método dependerá sempre do orçamento e o tipo de estudo que se pretende realizar (MIRELMAN *et al.*, 1997; HAQUE *et al.*, 1998; STARK *et al.*, 2008).

6. CONCLUSÕES

- A alta prevalência de enteroparasitos deve-se a provavelmente a baixa renda familiar, deficiência no saneamento básico e a falta de cuidados em relação água consumida pela família, expondo as crianças ao risco de novas infecções e promovendo a manutenção da transmissão das parasitoses.
- Os iniciadores selecionados através da análise virtual *in silico* apresentaram bom desempenho *in vitro*, sendo capazes de amplificar segmentos gênicos específicos da *E. histolytica* e *E. dispar*.
- A metodologia padronizada da reação em cadeia da polimerase (PCR) para o diagnóstico específico da *E. histolytica* e *E. dispar* em amostra de fezes mostrou-se uma ferramenta viável para discriminação da infecção em inquéritos epidemiológicos.
- O ensaio imunoenzimático (ELISA) e a PCR são adequados para diagnóstico da *E. histolytica*, apresentando índices semelhantes de sensibilidade e especificidade, entretanto o ELISA é menos laborioso, sendo de rápida e fácil execução.
- A prevalência da *E. dispar* é 4,6 vezes maior que a *E. histolytica* na população escolar estudada.

ABEP - Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa. Critério padrão de classificação econômica Brasil/ 2008. ABEP, 2008.

ABD-ALLA, M.D.; RAVDIN, J.I. Diagnosis of amebic colitis by antigen capture ELISA in patients presenting with acute amebic diarrhea in Cairo, Egypt. *Tropical Medicine & International Health*, v. 7, p. 365–370, 2002.

ABD-ALLA, M.D.; JACKSON, T.F.H.G.; REDDY, S.; RAVDIN, J.I. Diagnosis of invasive amebiasis by enzyme-linked immunosorbent assay of saliva to detect amebic lectin antigen and anti-lectin immunoglobulin G antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 06, p. 2344–2347, 2000.

ACA, I.S.; KOBAYASHI, S.; CARVALHO Jr., L.B.; TATENO, S.; TAKEUCHI, T. Prevalence and pathogenicity of *Entamoeba histolytica* in three different regions of Pernambuco, Northeast Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 36, n.06, p. 519–524, 1994.

ACKERS, J.P. The diagnostic implications of the separation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Journal of Bioscience*, v. 27, n .6, p. 573–578, 2002.

ACUNA-SOTO R.; SAMUELSON J.; DE-GIROLAMI P.; ZARATE L.; MILLAN-VELASCO F.; SCHOOLNICK G.; WIRTH D. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 48, n.01, p. 58–70, 1993.

AGUIERRA, A.; WARHURST, D.C.; GUHL, F.; FRAME, I.A. Polymerase chain reaction-solution hybridization enzyme-linked immunoassay (PCR-SHELE) for the differential diagnosis of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.89, p.187–188, 1995.

ANDRADE, D. R.; ANDRADE Jr., D.R. Amebíase. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo, Ed. Atheneu, p. 1149–1167, 1996.

AYEH-KUMI, P.F.; ALI, I. M.; LOCKHART, L.A.; GILCHRIST, C.A.; PETRI, W.A.Jr.; HAQUE, R. *Entamoeba histolytica*: genetic diversity of clinical isolates from Bangladesh as demonstrated by polymorphisms in the serine rich gene. *Experimental Parasitology*, v.99, p. 80–88, 2001.

BARNAWI, A.B.; TONKAL, A.M.; FOUAD, M.A.; AL-BRAIKEN, F.A. Detection of *Entamoeba histolytica/dispar* in stool specimens by using enzyme-linked immunosorbent assay in the population of Jeddah City, Saudi Arabia. [*Journal of the Egyptian Society of Parasitology*](#), v.37, p. 143–150, 2007.

BENETTON M.L; GONCALVES A.V; MENEGHINI M.E; SILVA E.F; CARNEIRO M. Risk factors for infection by the *Entamoeba histolytica/E. dispar* complex: an epidemiological study conducted in outpatient clinics in the city of Manaus, Amazon Region, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 99, n. 7, p. 532–540, 2005.

BERNAL-REDONDO, R. Entamoebosis–Amibiasis intestinal *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar*. Boletín Médico del Hospital Infantil de México, v. 58, n. 4, p. 217–219, 2001.

BLESSMANN, J.; VAN, L. P.; NU, P. A. T.; THI, H.D.; MYHSOK, B.M.; BUSS, H.; TANNICH, E. Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in Central Vietnam. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 66, n. 5, p. 578–583, 2002.

BRAGA, L.L.B.C.; GOMES, M.L.; SILVA, M.W.; FAÇANHA, Jr., FIUZA, L.; MANN, B. J. Household epidemiology of *Entamoeba histolytica* infection in an urban community in northeastern Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 65, p. 268–271, 2001.

BRAGA, L. L.; LIMA, A.A.M; SEARS, C.L, NEWMAN, R. D.; WUHI, T.; PAIVA, C.A. Seroepidemiology of *Entamoeba histolytica* in slum northeast Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v.55, p.693-697, 1996.

BRAGA, L.L.B.C.; 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. Journal of Clinical Microbiology, v. 10, p.3044-3045, 1998.

BRITTEN, D.S.; WILSON, 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 *Entamoeba dispar* in feces. Journal of Clinical Microbiology, v.35, n. 05, p.1108–1111, 1997.

BUSCHINI, M.L.; PITNER, E.; CZERVINSKI, T. MORAES I.F.; MOREIRA, M.M.; SANCHES, F.H. Spatial distribution of enteroparasitoses among school children from Guarapuava, state of Paraná, Brazil. Revista Brasileira de Epidemiologia, v.10, p. 568–578, 2007.

CALDERARO, A.; GORRINI, C.; BOMMEZZADRI, S.; PICCOLO, G.; DETTORI, G.; CHEZZI, C. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: comparison of two PCR assays for diagnosis in a non–endemic setting. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 100, p. 450–457, 2006.

CASAL – COMPANHIA DE SANEAMENTO DE ALAGOAS. Áreas abastecidas: água e esgoto. Maceió: Gerência de Esgoto, impresso, 2007.

CCZ – CENTRO DE CONTROLE DE ZONÓSES DE MACEIÓ. Números de imóveis existentes no município de Maceió, segundo dados do Programa Municipal de Controle da Dengue. Maceió: Coordenação de Doenças Transmitidas por Vetores e Animais Peçonhentos, impresso, 2007.

CHAUDHRY, O.A.; [PETRI, W.A.JR.](#) Vaccine prospects for amebiasis. Expert review of vaccines, v. 4, n. 5, p. 657-668, 2005.

CLARK, C.G. Amoebic disease: *Entamoeba dispar*, an organism reborn. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 92, p.361–364, 1998.

CLARK, G.C. PCR detection of pathogenic *Entamoeba histolytica* and differentiation from other intestinal protozoa by riboprinting. In: Persing, C., Smith, T.E., White, T.J. Ed. Diagnostic Molecular Microbiology. ASM Press, Washington, DC, p. 468–474, 1993.

CLARK, G.C.; DIAMOND, L.S. Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* from other intestinal protozoa by riboprinting. Archives of Medical Research, v. 23, p.15–16, 1992.

CLARK, C.G.; DIAMOND, L.S. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. Clinical Microbiology Reviews, v. 15, n. 03, p. 329–341, 2002.

CLARK, C.G.; DIAMOND, L.S. Ribosomal RNA genes of “pathogenic” and “nonpathogenic” *Entamoeba histolytica* are distinct. [Molecular and Biochemical Parasitology](#), v. 49, p. 297–302, 1991.

CONDE–BONFIN, M.C.; MORA–ZERPA, C. *Entamoeba histolytica*: Un desafío vigente. Salud Publica de Mexico, v. 34, n. 03, p. 335–341, 1992

COSTA-MACEDO, L. M.; MACHADO-SILVA Jr., RODRIGUES-SILVA, R. OLIVEIRA, L. M.; VIANNA, M. S. R.; Enteroparasitoses em pré-escolares de comunidades favelizadas da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Caderno de Saúde pública, v.14, p. 851-855, 1998.

DIAMOND, L.S. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. **Science**, v. 134, n. 3475, p. 336 – 337, 1961.

[DIAMOND L.S.](#); [CLARK C.G.](#) A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. [Journal Eukaryot Microbiology](#), v. 40, p. 340–400, 1993.

DOGANCI, L; TANNYUKSEL, M; DOGANCI, T. Accurate diagnosis is essential for amebiasis. World Journal Gastroenterology, v. 10, n. 8, p.1231, 2004.

DOURADO, A.; MACIEL, A.; ACA, I.S. Ocorrência de *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* em pacientes ambulatoriais de Recife, PE. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 39, n. 4, p.388–389, 2006.

DUARTE, I.A.C. Prevalência da **Entamoeba histolytica** em alunos de escolas públicas da cidade de Maceió. 2006. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco-Recife, 2006.

ESPINOSA–CANTELLANO, M.; MARTINEZ–PALOMO, A. Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease. Clinical Microbiology Reviews, v. 13, p. 318–331, 2000.

EVANGELOPOULOSA, A.; LEGAKISB, N.; VAKALISA, N. Microscopy, PCR and ELISA applied to the epidemiology of amoebiasis in Greece. *Parasitology International*, v. 50, p. 185–189, 2001.

EVANGELOPOULOS, A.; SPANAKOS, G.; PATSOULA, E.; VAKALIS, N.; LEGAKIS, N. A. A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 94, p. 233–240, 2000.

FERREIRA, G. R.; ANDRADE C. F. S. Alguns aspectos socioeconômicos relacionados a parasitoses intestinais e avaliação de uma intervenção educativa em escolares de Estiva Gerbi, SP. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.38, p.402–405, 2005.

FONTE, L.G. Amebiasis: enfoques actuales sobre su diagnóstico, tratamiento y control. Ed. Elfos Scientiae. La Habana, 2000.

FOTEDAR, R.; STARK, D.; BEEBE, N.; MARRIOTT, D.; ELLIS, J.; HARKNESS, J. Laboratory Diagnostic Techniques for *Entamoeba* Species. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 20, n. 3, p. 511–532, 2007a.

FOTEDAR, R.; STARK, D.; BEEBE, N.; MARRIOTT, D.; ELLIS, J.; HARKNESS, J. PCR detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in stool samples from Sydney, Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, p. 1035–1037, 2007b.

FREITAS, M.A.; VIANNA, E.N.; MARTINS, A.S.; SILVA, E.F.; 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.

GARCÊS, S.P.S.; LIMA, A.O.S. Desenho e validação *in silico* de primers intragenéricos. II Workshop de Técnica da Informação Aplicada ao Meio Ambiente. Congresso Brasileiro de Computação, Sequenciamento de DNA, 2004.

GIRALDI, N.; VIDOTTO, O.; NAVARRO, I. T.; GARCIA, J. L. Prevalência de enteroparasitoses em crianças de creches e alunos da rede municipal de ensino de Rolândia, Paraná. *Revista da Sociedade Brasileira de medicina Tropical*, v.34, p.385–387, 2001.

GONIN, P.; TRUDEL, L. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR and Enzyme–Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41 p. 237–241, 2003.

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

GONZALEZ–RUIZ, A.; HAQUE, R.; REHMAN, T.; AGUIRRE ,A.; HALL, A.; GUHL, F.; WARHURST, D.C.; MILES, M. Diagnosis of amebic dysentery by detection of *Entamoeba histolytica* fecal antigen by an invasive strain–specific, Monoclonal Antibody–Based Enzyme–Linked. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, n. 04, p. 964–970, 1994b.

HAGHIGHI, A.; KOBAYASHI, S.; TAKEUCHI, T.; MASUDA, G.; NOZAKI T. Remarkable genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a limited geographic area. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p.4081–4090, 2002.

HAL, S.J.V.; STARK, D.J.; FOTEDAR, R.; MARRIOTT, D.; T ELLIS, J.; HARKNESS, J.L. Amoebiasis: current status in Austrália. *The Medical Journal of Australia*, v. 189, n.08, p.412–416, 1997.

HAQUE, R.; ALI, I.K.M.; SACK, B.; FARR, B.M.; RAMAKRISHNAN, G.; PETRI, W.A. Jr. Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children. *Journal of Infectious Diseases*, v.183, p.1787–1793, 2001.

HAQUE, R.; ALI, I.K.M.; AKTHER, S.; PETRI, W. A.Jr. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 2 p. 449–452, 1998.

HAQUE, R.; FARUQUE, A.S.G.; HAHN, P.; LYERLY, D.M.; PETRI, W.A. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. *Journal of Infectious Diseases.*, v.175, p.734–736, 1997.

HAQUE, R.; MOLLAH, U.R.N.; ALI, I.K.M.; ALAM, K.; EUBANKS, A.; LYERLY, D.; PETRI, W.A.Jr. Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, p. 3235–3239, 2000.

HAQUE, R.; MONDAL, D.; KIRKPATRICK, B. D.; AKTHER, S.; FARR, B. M.; SACK, R. B. PETRI, W.A. Jr. Epidemiologic and clinical characteristics of acute diarrhea with emphasis on *Entamoeba histolytica* infections in preschool children in an urban slum of dhaka, Bangladesh. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 69, n. 4, p. 398-405, 2003.

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. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33, n.10, 2558–2561, 1995.

HAQUE, R.; PETRI, W.A.Jr. Diagnosis of Amebiasis in Bangladesh. *Archives o f Medical Research*, v. 37, p. 273–276, 2006.

HECKENDORN, F.; GORAN, E.K.N.; FELGAR, I.; VOUNATSOU, P.; YAPI, A.; OETTLI, A.; MARTI, H.P.M.; DOBLER, M.; TRAORE, K.; LOHOURIGNON, L.; LENGELER, C. Species–specific field–testing of *Entamoeba* spp. in an area of high endemicity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.96, p.521–528, 2002.

HOFFMANN, W.A.; PONS, J.A.; JANER, J.L. The sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. Puerto Rico Journal Public Health, v. 2, p. 283–298, 1934.

HOOSHYAR, H.; REZAIAN, M.; KAZEMI, B.; JEDDI–TEHRANI, M.; SOLAYMANI–MOHAMMADI, S. The distribution of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in northern, central, and southern Iran. Parasitology Research, v. 94, p. 96–100, 2004.

HUSTON, C.D.; PETRI, W.A.Jr. Amebiasis: clinical Implications of the recognition of *Entamoeba dispar*. Tropical and Travel Medicine, v. 01, p. 441–447, 1999.

HUSTON, C.D.; HAQUE, R.; PETRI, W.A. Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. Expert Reviews in Molecular Medicine, (99)00059-9a.pdf, 1999.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – *Cidades*. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Acesso em: 20 de maio de 2008.

IMPAR – INSTITUTO MUNICIPAL DE PLANEJAMENTO E AÇÃO REGIONAL. Instituto Municipal de Planejamento e Ação Regional – Prefeitura Municipal de Maceió, mimeog., 1995.

JIANG, B.; YANG, G.Y.; YU, X.M.; CHENG, A.C.; BI, F.J. A case report: *Entamoeba histolytica* infections in the rhesus macaque, China. Parasitology Research, v. 103, p. 915–917, 2008.

KAHN, H.A.; SEMPOS, C.T. Statistical Methods in Epidemiology. Monographs in Epidemiology and Biostatistics. Oxford University Press, New York, v. 12, 1989.

KHAIRNAR K.; PARIJA S.C. A novel nested multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for differential detection of *Entamoeba histolytica*, *E. moshkovskii* and *E. dispar* DNA in stool samples. BMC Microbiology, v. 7, p.47, 2007.

KATZWINKEL–WLADARSCH, S.; LOSCHER, T.; RINDER, H. Direct amplification and differentiation of pathogenic and non–pathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from stool specimens. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 51, p. 115–118, 1994.

KEBEDE, A.; VERWEIJ, J.; DORIGO-ZETSMA, W.; SANDERS, E.; MESSELE, T.; VAN LIESHOUT, L.; PETROS, B.; POLDERMAN, T. Overdiagnosis of amoebiasis in the absence of *Entamoeba histolytica* among patients presenting with diarrhoea in Wonji and Akaki, Ethiopia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 97, p. 305–307, 2004.

KOBAYASHI, J.; HASEGAWA, H.; FORLI, A. A.; NISHIMURA, N. F.; YAMANAKA, A.; SHIMABUKURO, T.; SATO, Y. Prevalence of intestinal parasitic infection in five farms in Holambra, São Paulo, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.37, p.13-18, 1995.

KREADER, C.A. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n.03, p.1102–1106, 1996.

LANTZ, P.G.; MATSSON, M.; WADSTROM, T.; RADSTROM, P. Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *Journal of Microbiological Methods*, v. 28, p. 159–167, 1997.

LEBBAD, M.; SVARD, S.G. PCR differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from patients with amoeba infection initially diagnosed by microscopy. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v. 37, p.680–685, 2005.

LEIVA, B.; LEBBAD, M.; WINIECKA–KRUSNELL, J.; ALTAMIRANO, I.; TELLEZ, A.; LINDERA, E. Overdiagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Nicaragua: a microscopic, triage parasite panel and PCR study. *Archives of Medical Research*, v. 37, p. 529–534, 2006.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH, A.R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VÁVRA, J.; WALLACE, F.G. A newly revised classification of the Protozoa. *Journal of Protozoology*, v. 27, p. 37-58, 1980.

LOFTUS, B.; ANDERSON, I.; DAVIES, R.; ALSMARK, U. C.; SAMUELSON, J.; AMEDEO, P.; RONCAGLIA, P.; BERRIMAN, M.; HIRT, R.P.; MANN, B.J.; NOZAKI, T.; SUH, B.; POP, M.; DUCHENE, M.; ACKERS, J.; TANNICH, E.; LEIPPE, M.; HOFER, M.; BRUCHHAUS, I.; WILLHOEFT, U.; BHATTACHARYA, A.; CHILLINGWORTH, T.; CHURCHER, C.; HANCE, Z.; HARRIS, B.; HARRIS, D.; JAGELS, K.; MOULE, S.; MUNGALL, K.; ORMOND, D.; SQUARES, R.; WHITEHEAD, S.; QUAIL, M.A.; RABBINOWITSCH, E.; NORBERTCZAK, H.; PRICE, C.; WANG, Z.; GUILLEN, N.; GILCHRIST, C.; STROUP, S.E.; BHATTACHARYA, S.; LOHIA, A.; FOSTER, P.G.; SICHERITZ–PONTEN, T.; WEBER, C.; SINGH, U.; MUKHERJEE, C.; EL–SAYED, N.M.; PETRI, W.A.Jr.; CLARK, C.G.; EMBLEY, T.M.; BARRELL, B.; FRASER, C.M.; HALL, N. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*, v. 433, p. 865–868, 2005.

LOHIA, A. The cell cycle of *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 253, p. 217–222, 2003.

LUACES, A. L.; BARRETT, A. J. Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochemistry Journal*, v. 250, p. 903–909, 1998.

LUCAS, R.; UPCROFT, J.U. Clinical significance of the redefinition of the agent of amoebiasis. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, v. 43, n. 04, p. 183–187, 2001.

MACEDO, H. S. Prevalência de parasitos e comensais intestinais em crianças de escolas da rede pública municipal de Paracatu (MG). *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v.37, p.209–213, 2005.

MARQUES, E.; GOMES, S.; GONÇALVES, R.; TOLEDO, D.; MOYA, E.; CAZZOLATO, D.; FERREIRA, M.P. *Assentamentos precários no Brasil urbano*. Brasília/São Paulo: Ministério das Cidades/Centro de Estudos da Metrópole, 2007.

MARSHALL, M.M.; NAUMOVITZ, D.; ORTEGA, Y.; STERLING, C. Waterborne protozoan pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, v.10, n. 1, p. 67–85, 1997.

MARTINEZ–PALOMO, A.; ESPINOSA–CANTELLANO, M. New Understanding and New Goals. *Parasitology Today*, v.14, n. 01, p. 1–3, 1998.

MIRELMAN, D.; NUCHAMOWITZ, Y.; STOLARSKY, 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*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, p.2405–2407, 1997.

MOLINA, A.L.; TOBO, P.R. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. Série – Biologia molecular atualização, Parte 2, Ed. Associada da Einstein, v. 2, n. 2, p. 139–140, 2004.

MONTEIRO, L.; BONNEMAISON, D.; VEKRIS, A.; PETRY, K. G.; BONNET, J.; VIDAL, R.; CABRITA, J.; MEGRAUD, F. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, n.04, p.995–998, 1997.

MORAN, P.; RAMOS, F.; RAMIRO, M.; CURIEL, O.; GONZALEZ, E.; VALADEZ, A.; GOMEZ, A.; GARCIA, G.; MELENDRO, E.I.; XIMENEZ, C. *Entamoeba histolytica* and/or *Entamoeba dispar*: infection frequency in HIV_/AIDS patients in Mexico City. *Experimental Parasitology*, v.110, p. 331–334, 2005a.

MORAN, P.; RAMOS, F.; RAMIRO, M.; CURIEL, O.; GONZALEZ, E.; VALADEZ, A.; GOMEZ, A.; GARCIA, G.; MELENDRO, E.I.; XIMENEZ, C. Infection by human immunodeficiency virus–1 is not a risk factor for amebiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 73, p. 296–300, 2005b.

MORENO, A.C.; FILHO, A.F.; GOMES, T.A.; RAMOS, S.T.; MONTEMOR, L.P.; TAVARES, V.C.; FILHO, L.S.; IRINO, K.; MARTINEZ, M.B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. *Diagnostic. Microbiology and Infectious Disease*, v.6, n.1, p.50–57, 2010.

MYJAK, P.; KUR, J.; PIETKIEWICZ, H. Usefulness of new DNA extraction procedure for PCR technique in species identification of *Entamoeba* isolates. *Wiadomości Parazytologiczne*, v. 43, p. 163–170, 1997.

MYJAK, P.; KUR, J.; PIETKIEWICZ, H.; KOTLOWSKI, A.; NAHORSKI, W.; SZOSTAKOWSKA, B. Molecular differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from stool and culture samples obtained from Polish citizens infected in tropics and in Poland. *Acta Protozoologica*, v. 39, p. 217–224, 2000.

NESBITT, R. A.; MOSHA, F. W.; ASHRAF, M.; ASSENGA, C.; [LEE, C. M.](#) Amebiasis and comparison of microscopy to ELISA technique in detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Journal of the National Medical Association*, v.96, n. 5, p. 671-677, 2004.

NOVATI, S.; SIRONI, M.; GRANATA, S.; BRUNO, A.; GATTI, S.; SCAGLIA, M.; BANDI, C. Direct sequencing of the PCR amplified SSU rRNA gene of *Entamoeba dispar* and the design of primers for rapid differentiation from *Entamoeba histolytica*. *Parasitology*, v. 112, p.363–369, 1996.

NUNEZ, Y.O.; FERNANDEZ, M.A.; NUNEZ, D.; 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. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 64, n. 05–06, p. 293–297, 2001.

OIKARINEN, S.; TAURIAINEN, S.; VISKARI, H.; SIMELL, O.; KNIP, M.; VIRTANEN, S.; [HYÖTY, H.](#) PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants. ***Journal of Clinical Virology*, v. 44, n.03, p.211–214, 2009.**

OMS – Organización Mundial de la Salud - Medios auxiliares para el diagnóstico de las parasitosis intestinales. *Protozoos*, Lamina 5, 1994.

OMS/OPAS/UNESCO – Organización Mundial de la Salud/Organización Panamericana de la Salud/Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura. Consulta con expertos en amebiasis, Ciudad de México, v. 18, p. 13–14, 1997.

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 Tropica*, v. 92, p. 273–277, 2004.

PARIJA, S.C.; KHAIRNAR, K. Detection of excretory *Entamoeba histolytica* DNA in the urine, and detection of *E. histolytica* DNA and lectin antigen in the liver abscess pus for the diagnosis of amoebic liver abscess. *BMC Microbiology* v. 7, p.41, 2007.

PEREZ, A. C.; ARIZA, A. C.; UBEDA, O. J. M.; GUEVARA, B. D. C.; ROJAS, A. M.; LOZANO, S. C. Epidemiology of children's intestinal parasitism in the Guadalquivir Valley, Spain. *Revista Española de Salud Pública*, v.71, p.547–552, 1997.

PETRI, W.A.Jr.; HAQUE, R.; LYERLY, D.; VINES, R.R. Estimating the impact of amebiasis on health. *Parasitology Today*, v.16 n.08, p. 320–321, 2000.

PETRI, W.A.Jr.; JACKSON, T.F.; GATHIRAM, V.; KRESS, K.; SAFFER, L.D.; SNODGRASS, T.L.; CHAPMAN, M.D.; KEREN Z.; MIRELMAN, D. Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. *Infection and Immunology*, v. 58, n. 6, p. 1802–1806, 1990.

PETRI, W.A.Jr.; SINGH, U. Diagnosis and management of amebiasis. *Clinical Infectious Diseases*, v. 29, p.1117–1125, 1999.

PILLAI, D. R.; KEYSTONE, J. S.; SHEPPARD, D. C.; MACLEAN, J. D.; MACPHERSON, D. W.; KAIN, K. C. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: Epidemiology and comparison of diagnostic methods in a setting of nonendemicity. *Clinical Infectious Diseases*, v. 29, p.1315–1318, 1999.

PINHEIRO, S.M.B.; CARNEIRO, R.M.; ACA, I.S.; IRMAO 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. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 70, n. 02, p. 221–224, 2004.

POVOA, M.M.; ARRUDA, J.E.; SILVA, M.C.; BICHARA, C.N.; ESTEVES, P.; GABBAY, Y.B.; MACHADO, R.L. Diagnóstico de amebíase intestinal utilizando métodos coprocópicos e imunológicos em amostra da população da área metropolitana de Belém, Pará, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 16, p. 843–846, 2000.

QUEIROZ, P.O. avaliação e perspectiva de controle das geohelmintoses, esquistossomose mansônica e filariose linfática em áreas urbanas definidas de Maceió-Alagoas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Alagoas–Maceió, 2008.

RAMOS, F.; MORAN, P.; GONZALEZ, E.; GARCIA, G.; RAMIRO, M.; GOMEZ, A.; LEON, M.C.G.; MELENDRO, E.I.; VALADEZ, A.; XIMENEZ, C. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: prevalence infection in a rural Mexican community. *Experimental Parasitology*, v. 110, p.327–330, 2005a.

RAMOS, F.; MORAN, P.; GONZALEZ, E.; GARCIA, G.; RAMIRO, M.; GOMEZ, A.; LEON, M.C.G.; MELENDRO, E.I.; VALADEZ, A.; XIMENEZ, C. High prevalence rate of *Entamoeba histolytica* asymptomatic infection in a rural Mexican community. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 73, p.87–91, 2005b.

RAMOS, F.; VALDEZ, E.; MORAN, P.; GONZALEZ, E.; PADILLA, G.; GOMEZ, A.; RAMIRO, M.; MELENDRO, E. I.; MUNOZ, O.; CLARK, C. G.; XIMENEZ, C. Prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in a highly endemic rural population. *Archives of Medical Research*, v.31, p. 34–35, 2000.

RAMOS, F.; ZURABIAN, R.; MORH, P.; RAMIRO, M.; GOMEZ, A.C.; CLARK, G.; MELENDRO, E.I.; GARCIA G.; XIMENEZ, C. The effect of formalin fixation on the polymerase chain reaction characterization of *Entamoeba histolytica*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 93, p. 335–336, 1999.

RIVERA, W.L.; SANTOS, S.R.; KANBARA, H. Prevalence and genetic diversity of *Entamoeba histolytica* in an institution for the mentally retarded in the Philippines. *Parasitology Research*, v. 98, p. 106–110, 2006.

RIVERA, W.L.; TACHIBANA, H.; KANBARA, H. Field study on the distribution of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in the northern Philippines as detected by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.59, p.916–921, 1998.

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

RIVERO, Z.; BRACHO, A.; CALCHI, M.; DÍAZ, I.; ACURERO, E.; MALDONADO, A.; CHOURIO, G.; ARRÁIZ, N.; CORZO, G. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by polymerase chain reaction in a community in Zulia State, Venezuela. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 25, n. 1, p. 151-159, 2009.

ROMERO, J.L.; DESCOTEAUX, S.; REED, S.; OROZCO, E.; SANTOS, J.; SAMUELSON, J. Use of polymerase chain reaction and nonradioactive DNA probes to diagnose *Entamoeba histolytica* in clinical samples. *Archives of Medical Research*, v. 23, p. 277–279, 1992.

ROY, S.; KABIR, M.; MONDAL, D.; KARIM I.; ALI, M.; PETRI, W.A.Jr.; HAQUE, R. Real-Time-PCR assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 68, n. 05, p. 2168–2172, 2005.

SALLES J.M.; MORAES L.A.; SALLES M.C. Hepatic amebiasis. *The Brazilian Journal of Infections Diseases*, v. 7, n. 02, p. 96–110, 2002.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, Usa, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1987.

SAMIE, A.; OBI, L.C.; BESSONG, P.O.; STROUP, S.; HOUP, E.; GUERRANT, R.L. Prevalence and species distribution of *E. histolytica* and *E. dispar* in the Venda region, Limpopo, South Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.75, p.565–571, 2006.

SANCHEZ-GUILLEN, M.C.; PEREZ-FUENTES, R.; SALGADO-ROSAS H.; RUIZ-ARGUELLES, A.; ACKERS, J.; SHIRE, A.; TALAMAS-ROHANA, P. Differentiation of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* by PCR and their correlation with humoral and cellular immunity in individuals with clinical variants of amoebiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 66, n. 06, p. 731–737, 2002

SANTOS, H.L.; PERALTA, R.H.; MACEDO, H.W.; BARRETO, M.G.; PERALTA, J.M. Comparison of multiplex-PCR and antigen detection for differential diagnosis of *Entamoeba histolytica*. *The Brazilian Journal of Infections Diseases*, v.11, p.365–370, 2007.

SANUKI, J.; ASAI, T.; OKUZAWA, E.; KOBAYASHI, S.; TAKEUCHI, T. Identification of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* cysts in stool by polymerase chain reaction. *Parasitology Research* v. 83, p.96–98, 1997.

SARGEAUNT, P.G.; WILLIAMS, J.E.; GRENE, J.D. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 72, p. 519–521, 1978.

SATURNINO, A.C.R.D., MARINHO, E.J.C., NUNES, J.F.L.; SILVA, E.M.A. Enteroparasitoses em escolares de 1º grau da rede pública da cidade de Natal, RN. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* v.37, p.83-85, 2005.

SEEE – Secretaria do Estado da Educação e do Esporte. Superintendência de Gerenciamento Institucional, Diretoria de Acompanhamento e Avaliação da Gestão de Programas e Projetos, Gerência de Estatística e Informação. Indicadores Educacionais ano 2006 e 2007. ANO 2008.

SHIBAYAMA, M.; RIVERA-AGUILAR, V.; BARBOSA-CABRERA, E.; ROJAS-HERNÁNDEZ, S.; JARILLO-LUNA, A.; TSUTSUMI, V.; PACHECO-YEPEZ, J.; CAMPOS-RODRÍGUEZ, R. Innate immunity prevents tissue invasion by *Entamoeba histolytica*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 54, n.12, p.1032-42, 2008.

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. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 21, n. 03, p. 969–973, 2005.

SINGH, B. Molecular Methods for Diagnosis and Epidemiological Studies of Parasitic Infections. *International Journal for Parasitology*, v. 27, n. 10, p.1134–1145, 1997.

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

STANLEY Jr., S.L. Vaccines for amoebiasis: barriers and opportunities, *Parasitology*, v.133, p. 81-86, 2006.

STARK, D.; VAN HAL, S.; FOTEDAR, R.; BUTCHER, A.; MARRIOTT, D.; ELLIS, J.; HARKNESS, J. Comparison of stool antigen detection kits with PCR for the diagnosis of amebiasis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.46, p.1678–1681, 2008.

STAUFFER, M.; ABD-ALLA, J.; RAVDIN, J. Prevalence and Incidence of *Entamoeba histolytica* Infection in SouthAfrica and Egypt. *Archives of Medical Research*, v. 37, n. 2, p. 265–268, 2006

TACHIBANA, H.; CHENG,X. J.; KOBAYASHI, S.; MATSUBAYASHI, N.; GOTOH, S.; MATSUBAYASHI, K. High prevalence of infection with *Entamoeba dispar*, but not *E. histolytica*, in captive macaques. *Parasitology Research*, v. 87, p.14–17, 2001.

TACHIBANA, H.; KOBAYASHI, S.; NAGAKURA, K.; KANEDA, Y.; TAKEUCHI, T. Asymptomatic cyst passers of *Entamoeba histolytica* but not *Entamoeba dispar* in institutions for the mentally retarded in Japan. *Parasitology International*, v.49, p.31–35, 2000.

TACHIBANA, H.; KOBAYASHI, S.; OKUZAWA, E.; MASUDA, G. Detection of pathogenic *Entamoeba histolytica* DNA in liver abscess fluid by polymerase chain reaction. *International Journal for Parasitology*, v. 22, p. 1193–1196, 1992.

TACHIBANA, H.; KOBAYASHI, S.; TAKEKOSHI, M.; IHARA, S. Distinguishing pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* by polymerase chain reaction. *The Journal of Infectious Diseases*, v.164, p.825–826, 1991.

TANNICH, E.; HORSTMANN, R.D.; KNOBLOCH, J.; ARNOLD, H.H. Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*, v. 86, p. 5118–5122, 1989.

TANYUKSEL, M.; PETRI, W.A.Jr. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16 p. 713–729, 2003.

TOMÉ J.B.S.; TAVARES, R.G. Diferenciação entre *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* por meio de ensaio imunoenzimático para pesquisa de antígenos em amostras fecais. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 66, n. 3, p.305–307, 2007.

TANYUKSEL, M.; YILMAZ, H.; ULUKANLIGIL, M.; ARAZ, E.; CICEK, M.; KORU, O.; TAS Z.; PETRI, W.A.Jr. Comparison of two methods (microscopy and enzyme–linked immunosorbent assay) for the diagnosis of amebiasis, *Experimental Parasitology*, v. 110, p. 322–326, 2005.

URDANETA, H.; GUIMARÃES, S.; SILVA, E.F.; TAVARES, C.A.P. *Entamoeba histolytica*: Detection of coproantigens by purified antibody in the capture sandwich ELISA. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 36, n. 6, p. 539–545, 1994.

VALLE, P. R.; SOUZA, M. B. G.; PIRES, E. M.; SILVA, E. F.; GOMES, M. A. ARBITRARILY PRIMED PCR FINGERPRINTING OF RNA AND DNA IN *Entamoeba histolytica*, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.42, n.5, 2000.

VERWEIJ, J.J.; BLOTKAMP, J.; BRIENEN, E.A.T.; 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. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v.19, p. 358–361, 2000.

VERWEIJ, J.J.; ROY A.B.; TEMPLETON, K.; SCHINKEL, J.; BRIENEN, E.A.T.; ROOYEN, V.M.A.; LIESHOUT, A.L.V.; POLDERMAN, A.M. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using Multiplex Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 3, p. 1220–1223, 2004.

VERWEIJ, J.J.; VAN LIESHOUT, L.; BLOTKAMP, C.; BRIENEN, E.A.; VAN DUIVENVOORDEN, S.; VAN ESBROECK, M.; POLDERMAN, A.M. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* using PCR-SHELA and comparison of antibody response. *Archives of Medical Research*, v. 31(4 Suppl), p.44-46, 2000.

WALSH, J.A. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Reviews of Infectious Diseases*, v. 8, p. 228–236, 1986.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Amoebiasis. *Weekly Epidemiologic Record*. v. 72, p. 97–100, 1997.

WILDE, J.; EIDEN, J.; YOLKEN, R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A Rotaviruses by Reverse Transcriptase and Polymerase Chain Reactions. *Journal of Clinical Microbiology*, v.28, n.06, p.1300–1307, 1990.

WILLHOEFT, U.; BUSS, H.; TANNICH, E. DNA sequences corresponding to the ariel gene family of *Entamoeba histolytica* are not present in *E. dispar*. *Parasitology Research*, v. 85, p. 787-789, 1999a.

WILLHOEFT, U.; HAMANN, L.; TANNICH, E. A DNA sequence corresponding to the gene encoding cysteine proteinase 5 in *Entamoeba histolytica* is present and positionally conserved but highly degenerated in *Entamoeba dispar*. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 11, p. 5925–5929, 1999b.

YERA H.; TZEN, M.; DUPOUY–CAMET, J. Molecular biology for detection and characterization of protozoan infections in humans. *European Journal of Protistology*, v. 39, p. 435–443, 2003.

XIMÉNEZ, C. Epidemiology of Amebiasis in Mexico: A Molecular Approach. *Archives of Medical Research*, v. 37, p. 263–265, 2006.

XIMÉNEZ, C.; MORÁN, P.; ROJAS, L.; VALADEZ, A.; GÓMEZ, A. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 9, n.6, p. 1023-1032, 2009.

ZAMAN, S.; KHOO, J.; NG, S. W.; AHMED, R. ;KHAN, M.A.; HUSSAIN, R.; ZAMAN, V. Direct amplification of *Entamoeba histolytica* DNA from amoebic liver abscess pus using polymerase chain reaction. *Parasitology Research*, v. 86, p. 724–728, 2000.

ZENGZHU, G.; BRACHA, R.; NUCHAMOWITZ, Y.; CHENG, W.; MIRELMAN, D. Analysis by Enzyme–Linked Immunosorbent Assay and PCR of human liver abscess aspirates from patients in China for *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p.3034–3036, 1999.

ZINDROU, S.; OROZCO, E.; LINDER, E.; TELLEZ, A.; BJORKMAN, A. Specific detection of *Entamoeba histolytica* DNA by hemolysin gene targeted PCR. *Acta Tropica* v. 78, p. 117–125, 2001.

APÊNDICE

Apêndice 1
Termo de Consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da pesquisa: Amebíase intestinal. Discriminação da infecção causada pela *Entamoeba histolytica* e *E. dispar* utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em crianças em idade escolar da cidade de Maceió-AL.

Pesquisador responsável: Eliana Maria Mauricio da Rocha

Eu, abaixo assinado, responsável pelo(s) menor (es) _____

concordo que o(s) mesmo(s) participe(m) desta pesquisa sobre a presença de ameba nas crianças das escolas públicas da cidade de Maceió. Sei que a razão deste estudo é saber se existe ameba nas fezes das crianças e/ou adolescentes da nossa cidade.

Fui esclarecido sobre as perguntas que serão feitas através de um questionário, como também sobre a coleta de fezes para realização de exames no laboratório. Estou ciente de que serão doados os potes para coleta das fezes e que não terei nenhuma despesa com os exames a serem realizados. Também estou ciente que receberei os resultados dos exames que serão mantidos em sigilo e que os escolares parasitados detectados deverão ser indicados ao tratamento.

Fui informado dos benefícios que esta pesquisa poderá trazer. Admito que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas pelos responsáveis por esta pesquisa. Fui informado também que quando os resultados desta pesquisa forem apresentados, não serão revelados dados que possam identificar minha criança e/ou adolescente.

Sei que tenho a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo para minha criança e/ou adolescente.

Visto que nada tenho contra a pesquisa, concordo em assinar o presente termo de consentimento

Maceió, ____/____/____

Assinatura do responsável

Assinatura do pesquisador

QUESTIONÁRIO

Questionário nº (_____) EPF nº (_____)

Entrevistado _____ Idade _____ Parentesco com a criança _____

DADOS INDIVIDUAIS

Nome _____ da _____ criança: _____

Sexo: 1-Masculino 2-Feminino Data de nascimento ____/____/____

Naturalidade _____

Endereço residencial: _____ Bairro: _____

Escola _____ Estadual: _____

Bairro: _____

DADOS SOCIO-AMBIENTAIS

1 - Qual o tipo de moradia?

1-Alvenaria 2- taipa 3- mista 4- outra opção _____

2 - Qual a origem da água utilizada para beber?

1-rede pública 2- poço 3-água industrializada 4-açude 5-outra opção _____

3 – Qual a origem da água utilizada para lavar as louças e os alimentos?

1-rede pública 2- poço 3-água industrializada 4-açude 5-outra opção _____

4 - Você faz algum tipo de tratamento da água antes de utilizá-la para beber ?

1-Clorar a água 2-filtrar a água 3-ferver a água 4-outra opção _____

5 - Você faz algum tipo de tratamento da água antes de utilizá-la para cozinhar?

1-Clorar a água 2-filtrar a água 3-ferver a água 4-outra opção _____

6 – A sua casa tem banheiro? 1-sim 2- não CASO não: Qual a solução? _____

7 - Tem sanitário? 1-sim 2-não

8 - O banheiro tem água encanada para o sanitário? 1-sim 2-não

9 - Qual o destino dos dejetos do banheiro? 1-fossa 2-a céu aberto 3-OUTROS _____

10 - Viajou ou chegou de algum estado nos últimos 6 meses? 1-sim 2-não

Sim (onde?): _____

DADOS SOCIO- ECONÔMICO

11 - Moradia situação: 1-própria 2-alugada 3-cedida 4-invasa 5-outro: _____

12 - Renda familiar: 1-Um salário 2-Dois salários 3-Três salários 4- > ou <. Quanto? _____

13 - Nº de pessoas na casa: _____

14 – Bens.

BENS	Quantidade	Pontos
Televisão em cores		
Rádio		
Banheiro		
Automóvel		
Empregada mensalista		
Aspirador de pó		
Máquina de lavar		
Videocassete e/ou DVD		
Geladeira		
Freezer (aparelho independente ou parte da geladeira duplex)		
Total de pontos		

15 - Grau de instrução do chefe da família?

Grau de instrução	adicionar X	Pontos
Analfabeto / Primário incompleto		
Primário completo / Ginásial incompleto		
Ginásial completo / Colegial incompleto		
Colegial completo / Superior incompleto		
Superior		
Total de pontos		

Entrevistador: _____ Data: _____

Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Maceió – AL, 03/05/06

Senhor (a) Pesquisador (a),


O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), reunido em 17/04/06 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº 011577/2005-19 sob o título Amelioração intestinal. Discriminação da infecção causada pela Entamoeba histolytica e E. dispar utilizando o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e a Reação em Cadeia de sua autoria, vem por meio deste instrumento comunicar sua aprovação com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

Outrossim, recomendamos a observância do que consta na folha de rosto com respeito ao cumprimento dos prazos para entrega de relatórios, bem como o atendimento da referida Resolução, sobretudo no que se refere aos itens III, IV e V, (proteção ao sujeito) e das demais Resoluções da CONEP /CNS, quando for o caso (*).

Na eventualidade, de esclarecimentos adicionais este Comitê coloca-se à disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra referidas.

(* *Áreas temáticas Especiais*)




Prof. Dr. Walter Matias Lima
Coordenador do CEP/UFAL