

JOSÉ EDUARDO GOMES ARRUDA

**DIAGNÓSTICO E EPIDEMIOLOGIA DA *Entamoeba histolytica* EM
RESIDENTES DO MUNICÍPIO DE JURUTI- PARÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientadora: Dra. Marinete Marins Póvoa
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS.

Banca Examinadora: Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado
Centro de Investigações de Microorganismos,
FAMERP- SP.

Profa. Dra. Mônica Cristina de Moraes Silva
Centro Universitário do Pará, CESUPA.

Prof. Dr. José Ricardo dos Santos Vieira
Departamento de Fisiologia, UFPA.

Profa. Dra. Lourdes Maria Garcez Silveira (suplente)
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS.

Belém (PA), 25 de Abril de 2008.

Dedico este trabalho a minha esposa Inara e filhos (Uriel, Yuri e Ivan) que são as pessoas mais importantes da minha vida.

Aos meus pais (Ademar e Graça), avós Antônio (*in memoriam*) e Ruth e a minha irmã Ivana que foram responsáveis por minha educação e construção de caráter.

AGRADECIMENTOS

Ao Magnífico Reitor da Universidade Federal do Pará, Dr. Alex Fiúza de Mello;

A minha orientadora, mestra e exemplo a ser seguido Dra. Marinete Marins Póvoa, que sempre esteve presente nos momentos decisivos de minha vida acadêmica e profissional;

A Direção do Instituto Evandro Chagas por permitir o desenvolvimento do trabalho;

Ao Coordenador do programa de Pós Graduação em Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários, Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto;

Ao Encarregado da Divisão de Farmácia CF (S) Milton da Silva Monte do Hospital Naval de Belém, pelo apoio para execução do projeto;

A amiga e professora Dra. Mônica Cristina de Moraes Silva por sua colaboração e valiosa orientação nas mais diversas etapas;

Ao amigo MSc. Daniel Valle, por seu apoio incondicional durante a execução dos testes;

Ao MSc. Leonardo Sousa Carvalho pela contribuição na análise estatística;

A todos os pacientes que colaboraram com o projeto;

Aos amigos da Seção de Parasitologia/IEC e do laboratório do Hospital Naval de Belém que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	06
LISTA DE FIGURAS	07
RESUMO	08
ABSTRACT	09
1 INTRODUÇÃO	10
1.1 HISTÓRICO	10
1.2 BIOLOGIA	12
1.2.1 Morfologia	13
1.2.2 Ciclo Biológico	16
1.3 PATOGENIA	18
1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICA	19
1.4.1 Forma Assintomática	19
1.4.2 Forma Sintomática	20
1.4.2.1 Amebíase Intestinal	20
1.4.2.2 Amebíase Extra-Intestinal	22
1.5 DIAGNÓSTICO	24
1.5.1 Exame Parasitológico das Fezes	24
1.5.2 Métodos Imunológicos	25
1.5.2.1 Detecção de Anticorpos	25
1.5.2.2 Detecção de Antígenos	26
1.5.3 Métodos Moleculares	27
1.6 EPIDEMIOLOGIA	29

1.7	OBJETIVOS	33
1.7.1	Objetivo Geral	33
1.7.2	Objetivos Específicos	33
2	MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1	DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	34
2.2	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	35
2.3	COLETA E ANÁLISE DAS FEZES	35
2.3.1	Método Direto	36
2.3.2	Sedimentação Espontânea	36
2.4	PESQUISA DE COPROANTÍGENOS	36
2.5	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	37
2.5.1	Extração do DNA	37
2.5.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a	38
	Identificação de Espécies	
2.6	ANÁLISE DOS DADOS	40
3	RESULTADOS	41
4	DISCUSSÃO	51
5	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
	ANEXOS	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Iniciadores utilizados na amplificação do fragmento de 310 pb do DNAr episomal de <i>E. histolytica</i> e <i>E. dispar</i> (Blessmann <i>et al.</i> , 2002).	39
Tabela 2 – Prevalência de <i>E.histolytica/E.dispar</i> utilizando métodos parasitológicos (direto e sedimentação espontânea) nas 188 amostras do município de Juruti – Pa.	41
Tabela 3 – Resultado dos testes de ELISA (Wampole®) nas 188 amostras do município de Juruti – Pa.	42
Tabela 4 – Resultado dos métodos parasitológicos, ELISA, PCR e presença ou ausência de sintomas característicos de infecção por <i>E.histolytica</i> em 51 amostras fecais do município de Juruti – Pa.	43
Tabela 5 – Resultados dos testes coprocópicos e ELISA (Wampole®) em 188 amostras testadas.	45
Tabela 6 – Resultados dos testes ELISA (<i>E. histolytica</i> II. Wampole®) e PCR em 51 amostras testadas.	45
Tabela 7 – Relação entre os resultados do ELISA e a presença ou não de sintomas sugestivos de amebíase intestinal em 188 pacientes.	47
Tabela 8 – Relação entre os resultados do parasitológico e a presença ou não de sintomas de parasitose intestinal em 188 pacientes.	47
Tabela 9 – Relação entre os resultados da PCR e a presença ou não de sintomas sugestivos de amebíase intestinal em 51 pacientes.	48
Tabela 10 – Prevalência de parasitos intestinais nas 188 amostras utilizando métodos coprocópicos (direto e sedimentação espontânea) no Município de Juruti – Pa.	49
Tabela 11 – Distribuição dos pacientes portadores de parasitos intestinais de acordo com o gênero no município de Juruti – Pa.	50
Tabela 12 – Distribuição dos pacientes portadores de parasitos intestinais de acordo com a faixa etária no município de Juruti – Pa.	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– (A) Desenho esquemático de um Trofozoíta de <i>E. histolytica/ E. dispar</i> . (B) Fotografia de três Trofozoítas de <i>E. histolytica</i> .	15
Figura 2– (A) Desenho esquemático de um Cisto de <i>E. histolytica/ E. dispar</i> . (B) Fotografia de um Cisto de <i>E. histolytica/ E. dispar</i> .	15
Figura 3 – Ciclo Biológico da <i>E. histolytica/ E. dispar</i> .	17
Figura 4 – Necrose coliquativa.	23
Figura 5 – Localização da cidade de Juruti – Pará.	34
Figura 6 – Distribuição de sintomas declarados pelos pacientes durante a entrevista, sugestivos de amebíase intestinal.	46

RESUMO

Amebíase é a infecção no homem causada pelo protozoário *Entamoeba histolytica*, apresentam quadros sem manifestações clínicas até graves de elevada morbimortalidade e sendo responsável por milhões de casos de disenteria e abscessos hepáticos a cada ano. Os dados epidemiológicos da amebíase no Brasil estão sendo reavaliados desde que a *Entamoeba histolytica* (patogênica) foi considerada espécie distinta da *Entamoeba dispar* (não patogênica). Neste estudo, realizou-se o diagnóstico da amebíase por meio de métodos parasitológicos, pesquisa de antígenos e método molecular em amostras fecais de pacientes residentes no município de Juruti, Pará, Brasil. Foram analisadas 188 amostras, com positividade em 28 (14,89 %) no método imunológico, que foi considerado como padrão ouro. A infecção por *E. histolytica* foi maior no grupo etário acima de 14 anos (8,51%) que no grupo de 0-14 anos (6,38%), porém sem significância estatística ($p > 0,05$). Houve discordância nos resultados dos métodos ELISA e coproscópico em 41 amostras (21,81%), com maior número de positivos no teste imunoenzimático. O diagnóstico pelo método de PCR apresentou positividade de 5,88% (3/51), resultado inferior ao observado na microscopia (7,84% - 4/51) e teste de ELISA (11,76% - 6/51). Assim, nossos resultados sugerem que a amebíase intestinal é um problema de saúde pública no município de Juruti.

Palavras-chave: *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, ELISA, PCR, epidemiologia.

ABSTRACT

The amebiasis is a human infection caused by the protozoa *Entamoeba histolytica*, which can be without any clinical manifestations till severe ones with high morbidity and mortality, and is responsible for millions of dysenteric cases and hepatic abscesses, annually. The epidemiological data of amebiasis in Brazil are under revision and reevaluation since the *Entamoeba histolytica* (pathogenic) was considered a distinct species from *Entamoeba dispar* (non pathogenic). In this study, it was carried out the diagnosis of amebiasis by parasitological and molecular methods and antigen search (ELISA) in stool samples from residents in the municipality of Juruti, Pará state, Brazil. We had analyzed 188 stool samples, with positivity in 28 (14,89 %) on the immunological test, which was considered as gold standard. The infection by *E. histolytica* was higher in the age group over 14 years old (8,51%) than in the one of 0-14 years (6,38%), but it was not showed statistical significance ($p > 0,05$). There was discordance between the results of ELISA and microscopical methods in 41 samples (21,81%), and the immuno enzymatic had detected more positive samples than the other one. The diagnosis by PCR method was positive in 3/51(5,88%), result inferior to the one observed by microscopy (7,84% - 4/51) and by ELISA (11,76% - 6/51). Thus, our results suggest that the intestinal amebiasis is an problem of public health in the municipality of Juruti.

Key words: *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, ELISA, PCR, epidemiology.

1 INTRODUÇÃO

Amebíase é a infecção no homem causada pelo protozoário *Entamoeba histolytica*, onde se observa desde quadros sem manifestações clínicas até quadros graves de elevada morbimortalidade, sendo responsável por milhões de casos de disenteria e abscessos hepáticos a cada ano (Wash, 1986). Possui ampla distribuição geográfica, sendo mais comum em regiões tropicais e subtropicais que apresentam precárias condições sócio-econômicas, facilitando desta forma a disseminação do parasito. As espécies do gênero *Entamoeba* pertencem ao Filo Sarcomastigophora, Subfilo Sarcodina, Superclasse Rhizopoda, Classe Lobosea, Ordem Amoebida, Subordem Tubulina e Família Endamoebidae. Os membros desta família são parasitos do aparelho digestivo ou dos tecidos de vertebrados, mas também podem apresentar formas de vida livre (Bruckner, 1992).

Desde que se passou a aceitar a *E. dispar* como espécie não patogênica e morfologicamente indistinguível da *E. histolytica*, os dados estatísticos sobre sua prevalência e distribuição necessitaram ser revistos. As supostas 480 milhões de pessoas infectadas (Guerrant, 1986), provavelmente sejam aproximadamente 48 milhões, visto que diversos estudos mostram que 90% das infecções apresentam como etiologia a *E. dispar* (Rey, 2001).

1.1. HISTÓRICO

As diarréias e as disenterias são descritas desde os tempos mais remotos, sem que se tivesse, conhecimento exato de suas causas. Hipócrates em 460 – 377 a.C. estabelecia que as disenterias fossem epidêmicas no verão e ocorriam particularmente em cidades quentes e úmidas. Evidências de

disenteria com provável etiologia amebiana, foram encontradas entre os Hebreus, desde os tempos bíblicos, quando eram reconhecidas como doenças disentéricas contagiosas (Clark, 1998; Tanyuksel & Petri, 2003).

Deve-se a Fedor Aleksandrovich Lösh em 1875, o encontro do trofozoíta de *E. histolytica*, ao analisar as fezes e úlceras intestinais de um lenhador de São Petesburgo, Rússia, que havia falecido de diarréia prolongada. Lösh inoculou de forma oral e retal em quatro cães o parasito encontrado e um dos animais desenvolveu um quadro de diarréia aguda em quem a necropsia revelou à presença de formas vegetativas em exsudatos purulentos das ulcerações da mucosa intestinal e nas fezes do animal. Desta forma conseguindo a reprodução experimental da amebíase intestinal e denominou este parasito como *Amoeba coli* (Clark, 1998; Bruckner, 1992).

Em 1883, Koch observou cinco casos de disenteria no Egito, dois dos quais com abscesso hepático. Analisando as úlceras do intestino grosso destes pacientes, encontrou numerosas amebas. Entre 1886 e 1887, o médico grego Stephanos Kartilus descreveu a ocorrência de amebas em amostras fecais de 150 pacientes com disenteria e 20 casos de abscesso hepático (Tanyuksel & Petri, 2003).

Em 1903, Fritz Schaudinn, propõe pela primeira vez a denominação *E. histolytica*, devido a grande capacidade do parasito em lisar tecidos (Martinez & Baez, 1989).

Em 1919, o parasitologista inglês Clifford Dobell publicou a monografia *The Amoebae Living a Man*, onde sugeria a existência de uma única espécie, a *E. histolytica*, que produz cistos tetranucleados, não

patogênica, podendo tornar-se patogênica quando influenciada pela microbiota intestinal ou outros fatores desconhecidos. A hipótese de Dobell ficou conhecida como teoria unicista. Em 1925 o parasitologista francês Emile Brumpt propôs a teoria dualista que citava a existência de duas espécies, morfologicamente indistinguíveis: uma patogênica chamada *E. histolytica* e outra não patogênica, chamada *E. dispar* (Clark, 1998; Tanyuksel & Petri, 2003).

Durante décadas, estudos imunológicos, bioquímicos e genéticos foram desenvolvidos para validar tais teorias, e em 1993, Diamond & Clark reescreveram o *status* taxonômico de *E. histolytica* (patogênica), considerando-a espécie diferente da *E. dispar* (não patogênica).

1.2. BIOLOGIA

Os membros do gênero *Entamoeba* caracterizam-se pelo núcleo esférico, de aspecto vesiculoso, possuindo cromatina periférica rica em RNA (Martinez-Palomo, 1989). A membrana delgada é revestida, internamente, de grânulos cromáticos (cromatina periférica), enquanto um ou mais grânulos se reúnem no centro ou perto deste (cromatina central), formando uma estrutura denominada cariossomo ou endossomo (Rey, 2001).

A membrana plasmática mede aproximadamente 10nm de espessura e é constituída por uma bicamada lipídica envolvida por um glicocálix de 20-30 nm de espessura. A *E. histolytica* não possui em sua estrutura citoesqueleto, microtúbulos citoplasmáticos (praticamente não existe microfilamentos de actina), sistema de membranas equivalente ao complexo de

Golgi e ao retículo endoplasmático e um sistema de lisossomas primários e secundários semelhantes aos encontrados em outros eucariontes (Martinez-Palomo, 1989).

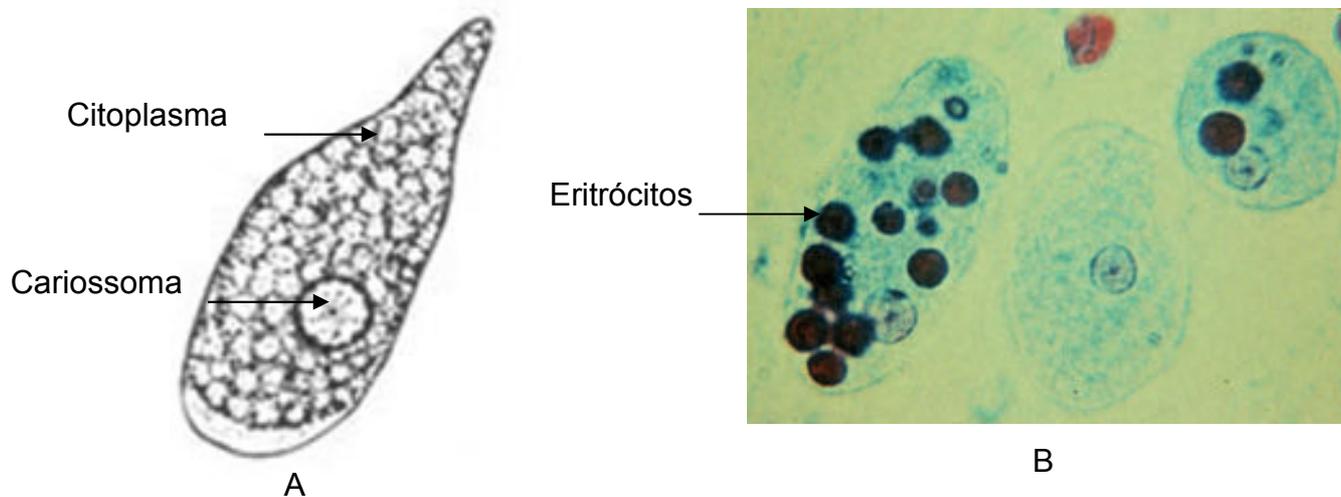
1.2.1 Morfologia

No ciclo biológico, são observados diversos estágios evolutivos do parasito. Os trofozoítas ou formas vegetativas são encontrados em fezes disentéricas, liquefeitas ou em culturas. Medem de 12 a 60 μm , onde formas maiores são encontradas na quadro invasivo (patogênica) e as menores como comensais em casos assintomáticos (Buckner, 1992). Possuem um único núcleo arredondado com diâmetro de 5 a 7 μm . São dotados de grande atividade, modificam continuamente sua forma, principalmente pela incessante emissão de pseudópodes que são grossos e digitiformes e se fazem em rápidas sucessões. A movimentação pode ser contínua ou intermitente, segundo as condições em que estão expostos, principalmente de temperatura e umidade. Na maioria das vezes os pseudópodes são lançados em uma das extremidades do trofozoíta, a que imprimem movimentação tipicamente direcional. Outras vezes, porém, retraem-se e novos pseudópodes são emitidos em outras direções. Observa-se com muita frequência, na região posterior a emissão dos pseudópodes, uma espécie de cauda, chamada região uróide, onde comumente, aderem resíduos celulares, hemácias, bactérias, muco ou detritos, conforme a natureza das fezes (Cunha, 1975). O citoplasma apresenta-se com nítida diferenciação entre o ectoplasma que é claro, hialino e

periférico, e o endoplasma, finamente granuloso, contendo vacúolos e restos alimentares (Feria-Velasco *et al.*, 1976) (Figura 1).

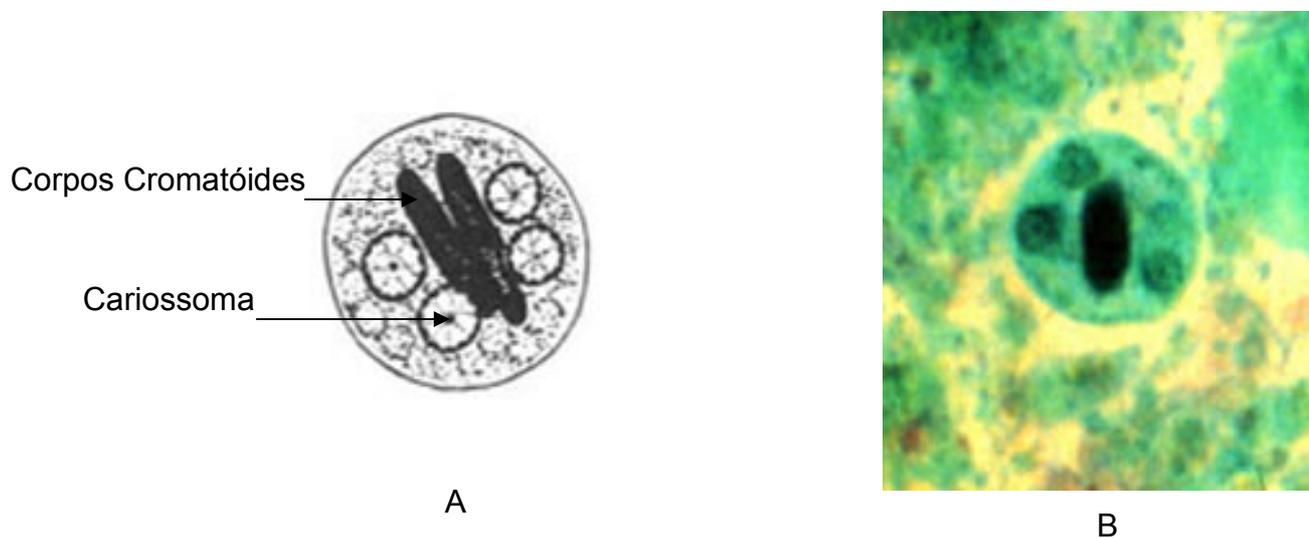
A forma precística é intermediária entre o trofozoíta e o cisto. Geralmente é uninucleada, suas dimensões são menores que as do trofozoíta e em seu citoplasma, encontramos depósitos de glicogênio e corpos cromatóides, que são compostos de agregados ribossômicos e responsáveis pela síntese protéica (Bruckner, 1992; Tanyuksel & Petri, 2003).

A forma cística ou de resistência é observada em fezes sólidas ou pastosas do hospedeiro, são esféricas ou ovais, medindo de 8,5 a 19 μ m de diâmetro (Bruckner, 1992). Os núcleos variam de 1 a 4 com posições variáveis. Parte do citoplasma se acha ocupada por uma formação que contém glicogênio, chamado vacúolo de glicogênio. Geralmente os cistos possuem um único vacúolo de glicogênio, podendo ocupar posições diversas tanto na parte central como na periférica, que pode deslocar os núcleos e os corpos cromatóides (Cunha, 1975). Os corpos cromatóides, possuem 300 nm de comprimento por 40 nm de diâmetro e apresentam-se comumente sob a forma de bastonetes ou charutos curtos e grossos, com as pontas arredondadas (Martinez-Palomo, 1989) (Figura 2).



Fonte: www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/imagelibrary/amebiasis_il.htm

Figura 1 - (A) Desenho esquemático de um trofozoíta de *E. histolytica*/ *E. dispar*. (B) Fotografia de três trofozoítas de *E. histolytica*.



Fonte: www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/imagelibrary/amebiasis_il.htm

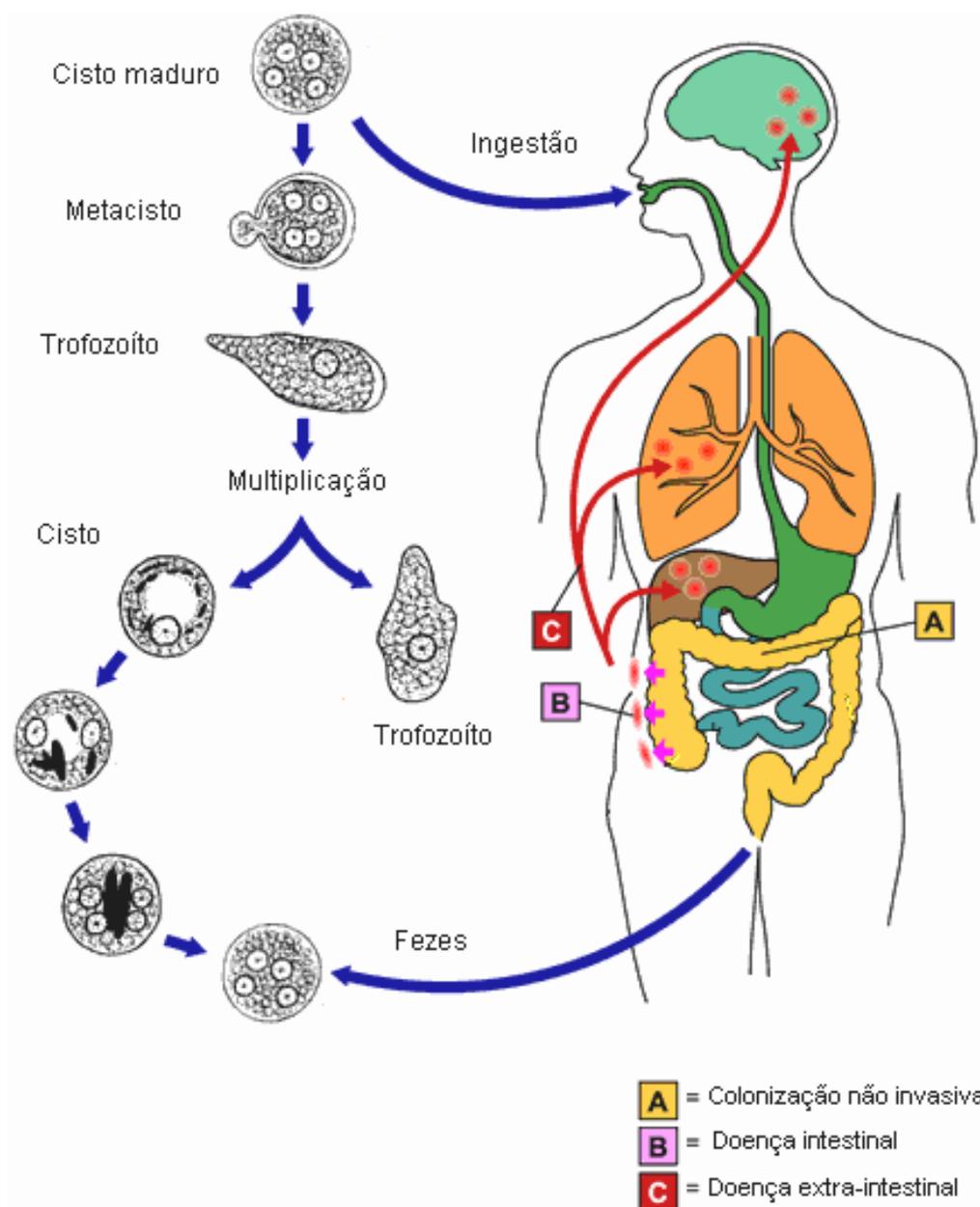
Figura 2 - (A) Desenho esquemático de um cisto de *E. histolytica*/ *E. dispar*. (B) Fotografia de um cisto de *E. histolytica*/ *E. dispar*.

O trofozoíta-metacístico é uma forma multinucleada que emerge do cisto no intestino delgado, onde sofre diversas divisões, dando origem aos trofozoítos (Bruckner, 1992).

1.2.2 Ciclo Biológico

O ciclo inicia pela ingestão de cistos maduros (tetranucleados) geralmente por meio de água ou alimentos contaminados. Após a ingestão, passam pelo estômago, resistindo à ação do suco gástrico, chegam ao final do intestino delgado ou início do intestino grosso, onde o desencitamento ocorre, sendo liberado um trofozoíta-metacístico tetranucleado, que sofre sucessivas divisões nucleares e citoplasmáticas, origina oito trofozoítos, que migram até o final do intestino grosso, onde colonizam e permanecem aderidos à mucosa, permanecendo como comensal, alimentando-se de detritos e bactérias (Ravdin, 1988).

Em determinado momento, alguns trofozoítos reduzem sua atividade, deixam de emitir pseudópodes, fagocitar e formar vacúolos digestivos, diminuem de tamanho e arredondam para constituir uma forma pré-cística. É formada a parede cística, rica em quitina e corpos cromatóides. O núcleo sofre divisões, dando origem a cistos tetranucleados capazes de resistir às condições do meio exterior e propagar-se. Ainda são desconhecidos, os fatores que levam o parasito a se encistar, acredita-se que determinadas condições adversas do meio estariam contribuindo no processo (Tanyuksel & Petri, 2003) (Figura 3).



Fonte: www.germology.com/Amebiasis_LifeCycle.gif, (modificado).

Figura 3 – Ciclo Biológico da *E. histolytica*/ *E. dispar*.

Sob a influencia de vários fatores, e na dependência do seu perfil genético e imunoenzimático, o trofozoíto, quando no intestino, assume dimensões maiores, conhecidas como forma magna, invade a mucosa

intestinal, fagocita hemácias e destrói diversos tipos de tecido, desde epitélio de revestimento de órgãos a ossos. A disseminação para outros órgãos, principalmente fígado, pulmões e cérebro, caracterizam a infecção extra-intestinal. (Martinez-Palomo, 1989; Salles *et al*, 1998).

1.3. PATOGENIA

A *E. histolytica* é a única ameba parasito do homem, capaz de invadir tecidos (Bruckner, 1992). Os fatores que concorrem para modificar o comportamento da mesma no hospedeiro, ainda não são totalmente esclarecidos (Gitler & Mirelman, 1986). Sabe-se que está ligada às condições climáticas e a fatores do hospedeiro como idade, estado nutricional, reatividade defensiva e ao parasitismo (Cunha, 1975).

As formas graves de amebíase aguda intestinal e extra-intestinal têm sido registradas em regiões de clima quente, como Egito, México, Índia e América do Sul. Em países de clima frio, como Estados Unidos e Canadá, é mais comum a forma assintomática, sendo raro o registro de enfermidades invasivas (WHO, 1997).

A patogenicidade e a virulência das diferentes cepas de *E. histolytica* são avaliadas por diversas características, entre elas: capacidade de produzir lesões em animais de laboratório; elevada eritrofagocitose; ausência de cargas elétricas distribuídas na superfície, o que facilitaria a interação com células de mamíferos, carregadas negativamente; perfil enzimático típico (a partir do protozoário identificaram-se vários zimodemos, dos quais sete são potencialmente patogênicos e 11 não patogênicos), e o contato inicial entre a

E. histolytica e a célula alvo. Essa aderência, é mediada pela lectina conhecida com N-Acetil galactosamina inibidora da galactose (Gal/GalNAc) (Huston *et al.*, 1999).

Após o contato inicial, a *E. histolytica* promove a lise da célula alvo, utilizando proteínas formadoras de poros, semelhantes ao sistema complemento, conhecidas como amebaporos (Bruckner, 1992). Existem três isoformas de amebaporos (A, B e C), sendo a isoforma C, a que possui a ação citotóxica mais potente. Segundo Leippe *et al.* (2005) os amebaporos são responsáveis por uma parte do efeito citolítico, promovendo mudanças no balanço osmótico da célula. Enzimas proteolíticas secretadas pela *E. histolytica* atuam juntamente com os amebaporos e são utilizadas na invasão tecidual, na degradação de substratos exógenos e em processos inflamatórios (Ravdin, 1988).

1.4. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

1.4.1. Forma Assintomática

A maioria das infecções humanas é assintomática, sendo o parasito um comensal do intestino grosso em cerca de 90% dos casos (Gonin & Trudel, 2003). A infecção é diagnosticada pelo encontro de cistos em amostras fecais. O encontro de formas trofozoítas é raro e caso ocorra, o mesmo não apresenta eritrócitos fagocitados em seu citoplasma. As infecções assintomáticas são em geral atribuídas à presença de *E. dispar*. (Tanyuksel & Petri, 2003).

1.4.2. Formas Sintomáticas

Em alguns indivíduos, o parasito pode invadir a mucosa intestinal, caracterizando a forma clínica denominada amebíases intestinal. Através da circulação sanguínea, o trofozoíta pode disseminar-se para outros órgãos como fígado, pulmão, cérebro, coração e pele, tais infecções podem ser leves a graves, podendo levar o hospedeiro a morte (Bruckner, 1992).

1.4.2.1 Amebíase Intestinal

São observadas úlceras intestinais típicas no cólon (especialmente no ceco), no sigmóide e no reto. As lesões são pequenas, variam de 0,1 a 0,5 cm de diâmetro, são arredondadas, com região central necrosada, rodeada por um tecido edematoso. O centro necrótico pode ficar hemorrágico, todavia, com maior freqüência, apresenta um material mucoide amarelado (Martinez-Palomo, 1999)

A Disenteria Amebiana inicia-se, freqüentemente, de modo agudo. O hospedeiro apresenta cólicas intestinais e diarréia com evacuações muito freqüentes, chegando muitas vezes a 10 ou mais ao dia, com fezes líquidas, muco-sanguinolentas ou mesmo muco-pio-sanguinolentas e febre geralmente moderada, traduzindo lesão ulcerativa e inflamação intestinal (Salles *et al.*, 1998). As formas agudas fulminantes, observadas em surtos endêmicos, acometem todo o cólon e são classificadas como disenteria aguda amebiana, de inicio brusco. É acompanhada de evacuações muco-pio-sanguinolentas e de manifestações gerais (perda de peso, nervosismo, flatulência, tenesmo e

febre) mais intensas, complicando-se frequentemente com perfurações intestinais múltiplas (Cunha, 1975; Tanyuksel & Petri, 2003).

A colite não disentérica é a forma mais comum. Manifesta-se por evacuações diarréicas ou não, com duas a quatro deposições por dia, de fezes moles ou pastosas, com muco ou sangue, acompanhada de flatulência, desconforto abdominal ou ligeira dor, com cólicas localizadas na região periumbilical. Estas manifestações intestinais conduzem a um quadro de fadiga e perda de peso corpóreo. Frequentemente ocorrem períodos de funcionamento intestinal normal, com alternância do quadro diarréico ou constipação intestinal. Muitas vezes a colite não disentérica é clinicamente confundida com diverticulite do cólon ou doença de Crohn (Salles *et al.*, 1998).

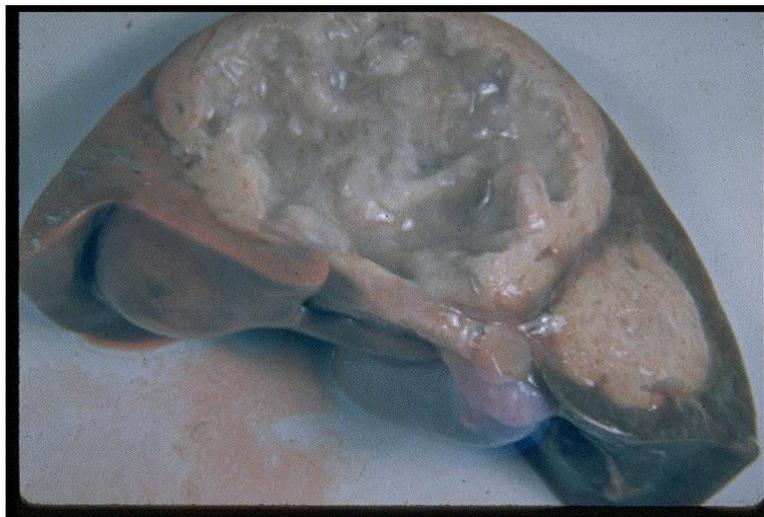
Decorrentes da atividade invasora da *E. histolytica*, diversas complicações podem ocorrer, sendo principalmente: apendicite amebiana, que apresenta os mesmos sinais e sintomas que a apendicite bacteriana. É resultado de um quadro clínico decorrente da ulceração ceco-apendicular, seguida de processo inflamatório do apêndice (Salles *et al.*, 1998); colite necrotizante, forma pouco comum, que atinge cerca de 0,5% dos indivíduos infectados. Todavia, de elevada gravidade, pois caracteriza-se por necrose, isquemia e hemorragia que comprometem grandes áreas do intestino grosso, mais precisamente do ceco e cólon ascendente, levando a perfurações e conseqüente peritonite. Sendo fatal em até 100% dos casos (Salles *et al.*, 1998); e ameboma, onde durante a invasão da mucosa intestinal, a *E. histolytica* pode provocar uma reação no tecido conjuntivo, com formação de massa granulomatosa, tendência ao crescimento contínuo e produção de

sintomatologia variada. O ameboma pode ser único ou múltiplo, localizando-se em ordem decrescente no ceco, cólon ascendente, retossigmóide, cólon transversal e cólon descendente. Acomete de 0,5 a 1% dos indivíduos com colite amebiana (Salles *et al.*, 1998).

1.4.2.2 Amebíase Extra- Intestinal

Ao invadir a submucosa do intestino e penetrar na corrente circulatória, a *E. histolytica* pode deslocar-se para outros órgãos, atingindo principalmente o fígado e mais raramente os pulmões, o cérebro, rins e pele. Os quadros mais graves da doença ocorrem principalmente em crianças, gestantes, desnutridos e imunossuprimidos (Salles *et al.*, 2003).

A amebíase hepática ocorre quando o trofozoíto de *E. histolytica* através da corrente sanguínea, chega ao fígado e inicia um processo inflamatório, levando a formação de lesões granulomatosas e extensa necrose tissular (Salles *et al.*, 2003; Tsutsumi, 1994). A lesão hepática, geralmente é única e localizada no lobo direito. Todavia, em consequência da ação das proteólises do parasito, aumentam as áreas de necrose pela formação de múltiplos abscessos que posteriormente se fundem em um único, podendo atingir, cerca de 80% da superfície do fígado. A lesão no lobo esquerdo é menos comum, podendo ocorrer múltiplos abscessos em casos de amebíase maciça. Os principais sintomas clínicos são dores no hipocôndrio direito, febre e hepatomegalia, podendo ocorrer calafrios, anorexia, perda de peso e surtos de diarreia (Salles *et al.*, 2003) (Figura 4).



Fonte: www.cvm.okstate.edu/instruction/kocan/disk5/images/img0023.jpg

Figura 4 – Necrose coliquativa.

A amebíase pleuropulmonar é pouco comum e ocorre devido a ruptura do abscesso hepático. A grande maioria dos casos de amebíase hepática atinge o lobo direito deste órgão e por isso as lesões pleuropulmonares são observadas em sua maioria, também no lado direito do tórax (Martinez-Palomo, 1989). O resultado da contaminação é traduzido por empiema, fístula hepatobrônquica e abscesso pulmonar (Salles *et al.*, 1998).

Microscopicamente, não são observadas diferenças importantes, entre a amebíase pulmonar e a hepática. A *E. histolytica*, pode ser encontrada no escarro de pacientes com amebíase pleuropulmonar (Martinez-Palomo, 1989).

A amebíase cerebral é infecção rara, nunca ocorrendo na ausência de amebíase hepática e pulmonar. A presença de trofozoítas no cérebro é explicada, quando encontramos concomitantemente um abscesso pulmonar

com passagem do parasito à circulação esquerda. As lesões cerebrais são encontradas preferencialmente no hemisfério cerebral esquerdo, podem ser únicas ou múltiplas, com diâmetro variando entre 0,2 a 5 cm. A presença do parasito em outros órgãos como pele, rins e supra-renais é considerada rara (Martinez-Palomo, 1989).

1.5. DIAGNÓSTICO

1.5.1 Exame Parasitológico das Fezes

O diagnóstico laboratorial da amebíase intestinal é feito tradicionalmente por pesquisa do parasito nas fezes. Em geral, formas císticas são encontradas em fezes consistentes e trofozoítas em material diarréico ou pastoso, a partir de técnicas de concentração onde observamos a forma cística e método direto a fresco, onde observamos a forma trofozoítica. Contudo, a inexperiência técnica, a eliminação intermitente do cisto de *E. histolytica*/ *E. dispar* e a não diferenciação morfológica das mesmas, podem promover erros no diagnóstico microscópico (Bruckner, 1992). A microscopia não identifica parasitos rompidos (Healey, 1978) e não pode ser utilizado para o diagnóstico da amebíase extra-intestinal, pois apenas 1/3 dos pacientes apresentam parasitoscopia positiva (Rodrigues-Filho *et al.*, 1963). Apesar dessas limitações e da baixa sensibilidade, tais métodos são utilizados para o diagnóstico da amebíase intestinal, pela facilidade de execução e baixo custo quando comparado a técnicas imunológicas e de biologia molecular.

1.5.2 Métodos Imunológicos

Os métodos imunológicos estão sendo cada vez mais empregados, principalmente na amebíase extra-intestinal, onde o exame parasitológico das fezes pode ser negativo e os métodos imunológicos apresentam sensibilidade próxima a 100%. Por isso, são considerados de escolha no diagnóstico da amebíase hepática, servindo também para distingui-los dos abscessos com outra etiologia (Silva, 1995).

1.5.2.1 Detecção de Anticorpos

A maioria das pessoas com amebíase intestinal, provenientes de áreas endêmicas, já foram expostas a *E. histolytica* diversas vezes. Esta situação faz com que o diagnóstico definitivo por meio da pesquisa de anticorpos seja inconclusivo, devido a impossibilidade de diferenciar infecções passadas, de infecções atuais (Caballero-Salcedo *et al.*, 1994; Gathiram & Jackson, 1990). Os testes sorológicos são mais úteis na identificação de infecção por *E. histolytica* em países desenvolvidos, onde a amebíase não é endêmica (Ohnishi & Murata, 1997; Walderich *et al.*, 1997; Weinke *et al.*, 1989). Em todos os casos, a combinação da sorologia com a detecção do parasito, através de pesquisa de antígenos ou técnicas moleculares, apresentam um incremento significativo no diagnóstico (Haque *et al.*, 1998).

Anticorpos específicos para *E. histolytica* são detectáveis em 75 a 85% dos pacientes com infecção sintomática (Tanyuksel & Petri, 2003). As técnicas mais utilizadas são: ensaio imunoenzimático (ELISA), reação de

imunofluorescência indireta (RIFI), aglutinação em látex, fixação do complemento e hemaglutinação indireta (HAI).

A sensibilidade do ELISA para detecção de anticorpos anti-*E. histolytica* no soro é de aproximadamente 100%, principalmente em casos de amebíase hepática (Tanyuksel & Petri, 2003). Anticorpos IgG são observados cerca de uma semana após o início dos sintomas em pacientes com colite amebiana e abscesso hepático, com valores superiores a 95%. Os testes sorológicos podem apresentar um resultado falso positivo, sendo necessária à repetição em casos duvidosos (Tanyuksel & Petri, 2003).

Van Door *et al.* (2005) compararam os testes de tira reativa, ELISA e de aglutinação em látex para sorodiagnóstico da *E. histolytica* em um hospital da Europa Ocidental. Todos os três testes métodos mostraram sensibilidade de 93,3% e especificidade de 98,1%, 97,1% e 99,5% respectivamente quando comparados a PCR.

1.5.2.2 Detecção de Antígenos

O teste de ELISA para detecção de antígenos nas fezes (coproantígenos), apresenta as seguintes vantagens, quando comparado a outros métodos utilizados no diagnóstico da amebíase intestinal: diferencia a *E. histolytica* da *E. dispar*, possui excelente sensibilidade e especificidade, é uma técnica de fácil execução e rápida, facilitando desta forma estudos de campo (Tanyuksel & Petri, 2003; Evangelopoulos *et al.*, 2001).

A pesquisa de antígeno amebiano tem sido utilizada em diversos fluidos corporais, incluindo saliva, soro e fluidos provenientes de abscessos.

Haque *et al.* (1995) utilizando o *Kit* TechLab *E. histolytica* test I ® detectaram a lectina Gal/Gal/Nac no soro de pacientes com abscesso hepático amebiano. Abd-Alla *et al.* (2000) detectaram antígenos amebianos na saliva de pacientes com abscesso hepático, onde observou 22% de sensibilidade e 97,4% de especificidade. Silva (2005) detectou antígenos amebianos em exsudatos de paciente com amebíase hepática. A detecção de antígenos circulantes no soro mostra-se como uma promissora ferramenta no diagnóstico do abscesso hepático amebiano (Tanyuksel & Petri, 2003).

1.5.3 Métodos Moleculares

Em circunstância da necessidade de diferenciação entre a *E. histolytica* e *E. dispar*, novas técnicas mais sensíveis que a microscopia de luz foram desenvolvidas. A reação em cadeia da polimerase (PCR) apresenta-se como ferramenta importante no diagnóstico da amebíase, com sensibilidade comparável a pesquisa de antígenos (Tanyuksel & Petri, 2003).

Romero *et al.*, (1992) e Acuña-Soto *et al.* (1993) desenvolveram uma técnica de PCR utilizando dois pares de oligonucleotídeos específicos para as seqüências repetitivas de 145 pb e 133 pb extra-nucleares, sendo utilizada no diagnóstico de *E. histolytica* e *E. dispar* em amostras fecais. Riviera *et al.* (1996) utilizaram um procedimento similar, com algumas modificações na extração de DNA em um estudo de 72 amostras fecais nas Filipinas, onde nenhuma amostra foi positiva para *E. histolytica* e 19 amostras apresentaram se positivas para *E. dispar*.

Posteriormente, Aguirre *et al.* (1995, 1997) associaram a técnica da PCR ao ensaio colorimétrico (ELISA-PCR ou PCR-SHELA) para diferenciar as duas espécies. Nesta PCR o DNA alvo da reação é hibridizado com sondas marcadas com biotina ou fluoresceína e os produtos da amplificação são detectados utilizando um espectrofotômetro. Estudos de Verweij *et al.* (2000) padronizaram uma técnica de extração de DNA utilizando o kit QIAamp® (Qiagen, Alemanha) para extração de DNA a partir de tecidos e utilizaram uma PCR em tempo real, tendo como alvo a seqüência repetitiva de 172 pb sendo utilizada no diagnóstico de *E. histolytica*. No mesmo período, Evangelopoulos *et al.* (2000) desenvolveram um nested-multiplex PCR para amostras fecais, que detectavam 10 trofozoítos/ 50 mg de fezes de *E. dispar* e 50 trofozoítos/ 50 mg de fezes de *E. histolytica*.

Mais recentemente, Blessmann *et al.* (2002) desenvolveram uma técnica de PCR em tempo real com elevada sensibilidade e especificidade, capaz de diferenciar *E. histolytica* de *E. dispar* em amostras fecais, utilizando a amplificação de um fragmento de 310 pb contido no gene do SSU rRNA marcados com sondas fluorescentes. Gonin & Trudel (2003) desenvolveram uma técnica de PCR utilizando a amplificação de um fragmento 135bp, capaz de diferenciar a espécie patogênica, da não patogênica e Verweij *et al.* (2004) padronizaram uma técnica de multiplex- PCR em tempo real para a detecção simultânea de *E. histolytica*, *G. lamblia* e *C. parvum*.

1.6 EPIDEMIOLOGIA

A amebíase é responsável por aproximadamente 100.000 mortes por ano, principalmente nas Américas do Sul e Central, África e Índia, onde observamos grande quantidade de casos invasivos e extra-intestinais. No mundo, a amebíase, juntamente com a malária e esquistossomose, são as três maiores causas de morte entre as doenças parasitárias, segundo a Organização Mundial da Saúde (Wash, 1986). A infecção por *E. histolytica* é endêmica na maioria dos países de clima tropical, onde as condições de higiene e educação sanitária são deficientes e observando-se prevalência de anticorpos específicos (referentes a infecções passadas e atuais) que excedem em alguns casos 50% da população (Tanyuksel & Petri, 2003). Em países desenvolvidos, os principais grupos de risco para a amebíase são homossexuais do gênero masculino, imigrantes, turista provenientes de áreas endêmicas, pacientes de instituições psiquiátricas e pacientes imunodeprimidos (Bruckner, 1992).

Nas Américas, o México é o país com maior número de casos e conseqüentemente, onde ocorrem os casos mais graves da doença. Estudos sorológicos mostram que 8,4% da população são infectados com a forma invasiva, o que representa cerca de 1.000.000 de casos por ano. A amebíase é mais freqüente nos primeiros anos de vida, com 11% da população entre 5 e 9 anos estão infectados (Cabalero-Salcedo, *et al.*, 1994). Ramos *et al.* (2005) utilizando diagnóstico molecular, em uma amostra de uma área rural mexicana, observaram prevalência de 13,8% para *E. histolytica* e de 9,6% para *E. dispar*.

A prevalência da amebíase no Brasil deve ser reavaliada, por acreditar-se que há superestimativa ou sub-estimativa desta protozoose em decorrência dos métodos classicamente empregados não diferenciarem a forma patogênica da não patogênica.

Kobaiashi *et al.* (1995) analisando amostras fecais do interior do Estado de São Paulo, observaram uma frequência de 3,2% para *E. histolytica*/*E. dispar*. No Estado de Santa Catarina, Shnack *et al.* (2003) utilizando pesquisa de coproantígenos em uma amostra proveniente do município de Criciúma, observaram prevalência de 56,4% para *E. histolytica*. Em contrapartida, Quadros *et al.* (2004) utilizando métodos coproscópicos em uma amostra do município de Lages, do mesmo Estado, encontraram prevalência de 2,5% para *E. histolytica*/*E. dispar*.

No nordeste do Brasil, Dourado *et al.* (2006) analisando amostras provenientes do Estado de Pernambuco, encontraram prevalência de 4,7% para *E. histolytica*/*E. dispar*. Todavia, com a análise pelo ELISA para pesquisa de coproantígenos, todas se mostraram negativas para a forma patogênica. Numa comunidade da periferia de Fortaleza, Braga *et al.* (2001) demonstraram prevalência de 14,9% para *E. histolytica* e 10,6% para *E. dispar*.

Na região Amazônica, diversos estudos epidemiológicos têm sido realizados, impulsionados pela precária condição sócio-econômica e de infraestrutura de grande parte das localidades desta região. Martins & Menezes (1994) detectaram parasitismo por *E. histolytica*/*E. dispar* em 84,0% dos indígenas da aldeia Parakanã no Estado do Pará. Posteriormente, Miranda *et al.* (1998) obtiveram positividade de 65,1% neste mesmo grupo. Póvoa *et al.*

(2000) identificaram freqüência de 28,99% de *E. histolytica* utilizando ELISA para pesquisa de coproantígenos em uma amostra do Estado do Pará. Mais recentemente, Silva *et al.* (2005) observaram uma freqüência de 29,35% de *E. histolytica* em amostras fecais da grande Belém- PA, utilizando ELISA para detecção de coproantígenos. No Estado do Amazonas, Beneton (2003) encontrou uma freqüência de 21,5% do complexo *E. histolytica/E. dispar*, sendo 1,5% a freqüência de *E. histolytica*. Enquanto que, Araújo & Fernández (2005) em Eurinepé, encontraram freqüência de 13,3% de *E. histolytica/E. dispar* em amostras fecais.

No estado do Pará, a amebíase invasiva é considerada importante problema de saúde com vários relatos de colite necrotizante e necrose do fígado (Rodrigues-Filho *et al.*, 1963; Chaves, 1987; Silva *et al.*, 1988; Salles *et al.*, 2003; Silva, 2005). Recentemente, Silva (2005) relatou a existência das duas espécies com alta freqüência de co-infecções, observando relação entre a presença de *E. histolytica* e as manifestações de diarreia e cólicas abdominais. Em seu estudo, encontrou diferentes polimorfismos genéticos em ambos os parasitos por meio da análise genética do *locus* 1-2, alguns dos quais ocorrendo exclusivamente em amostras isoladas de residentes do Estado do Pará.

Em abril de 2005, o Instituto Evandro Chagas, por solicitação da Alcoa/Omnia Minérios Ltda e com apoio da Secretaria Municipal de Saúde, realizou uma avaliação da situação de saúde no município de Juruti (oeste do Pará), onde revelou-se um cenário preocupante acerca da saúde no município, em especial a carência de registros dos casos de diarreia, onde constam entre

Janeiro de 2002 a Setembro de 2004, 2034 casos de diarreia (SINAN-MS) em contraste com a frequência de atendimentos relatados pelos moradores e auxiliares de enfermagem nos postos de saúde.

Segundo informações obtidas junto à população e agentes de saúde, a amebíase é relatada como provável principal patologia, embora a comprovação da etiologia da diarreia seja feita apenas por meio de exames parasitológicos de rotina. Assim, torna-se necessário esclarecer o papel da *E. histolytica* no município de Juruti utilizando métodos mais sensíveis para o diagnóstico.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo Geral

Realizar diagnóstico e descrever a epidemiologia da *E. histolytica* em indivíduos residentes no município de Juruti, Estado do Pará.

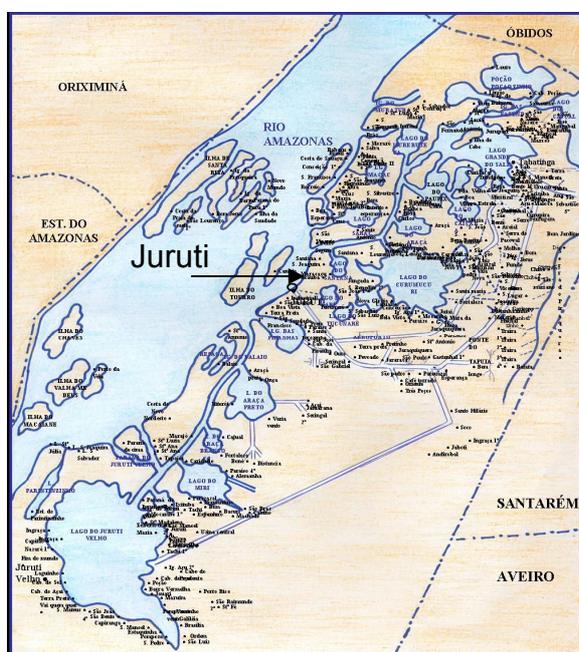
1.7.2 Objetivos Específicos

- a) Investigar a presença de *E. histolytica*/ *E. dispar* em indivíduos residentes no município de Juruti utilizando métodos coproscópicos, imunológico e biologia molecular para identificação de espécie;
- b) Comparar os métodos utilizados para o diagnóstico de *E. histolytica*;
- c) Determinar a prevalência das parasitoses intestinais por métodos coproscópicos em indivíduos residentes neste município;
- d) Avaliar a associação de variáveis epidemiológicas com a presença de enteroparasitos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O município de Juruti pertence à Mesorregião do baixo Amazonas e Microrregião de Óbidos, localizado a Oeste do Pará, às margens do rio Amazonas, e tem como limites: ao norte Oriximiná e Óbidos, a leste Óbidos e Santarém, ao sul Aveiro, a oeste o Estados do Amazonas e o município de Terra Santa. A sede do município possui as seguintes coordenadas geográficas: 02° 09'09"S e 56° 05'42"W. A população no ano de 2004, de acordo com a Secretaria Executiva de Estado de Planejamento, Orçamento e Finanças do Governo do Estado do Pará, era de 34.401 habitantes, sendo a maioria da área rural (23.169). Sua economia é de subsistência tendo como principal produto a farinha de mandioca e a pesca.



Fonte: Secretaria Executiva de Estado de Planejamento, Orçamento e Finanças do Governo do Estado do Pará.

Figura 5 – Localização da cidade de Juruti – Pará.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Participaram deste estudo, pacientes de diferentes faixas etárias e gênero, residentes na área urbana e rural no município de Juruti, Estado do Pará.

A demanda espontânea foi composta por pacientes, atendidos na Unidade Municipal de Saúde de Juruti, que após explicação detalhada sobre o conteúdo e objetivos do estudo, aceitaram participar voluntariamente e assinaram um termo de consentimento, sendo entrevistados quanto à presença de sintomas sugestivos de amebíase intestinal (diarréia, cólicas abdominais, constipação intestinal). Então, foi preenchida uma ficha individual com dados pessoais e relativos à infecção (Anexos 1 e 2).

O presente projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/IEC -n° 0030/05 de 23/10/2006) do Instituto Evandro Chagas.

2.3 COLETA E ANÁLISE DAS FEZES

Foram coletadas amostras fecais de 188 pacientes na faixa etária de 0 a 85 anos. No mesmo dia da coleta as amostras foram analisadas sob microscopia de luz, no laboratório da Unidade Municipal de Saúde de Juruti utilizando-se o método direto (salina/Lugol) e sedimentação espontânea. Uma parte do material fecal foi conservada à -4°C para posterior análise molecular e pesquisa de coproantígenos no Laboratório de Amebíase do Instituto Evandro Chagas/SVS.

2.3.1 Método Direto

Cerca de um grama do material fecal foi misturado a uma gota de solução salina em uma lâmina e sobre esta solução, colocada a lamínula. Este mesmo procedimento foi feito utilizando solução de Lugol. O material foi observado sob microscopia de luz utilizando objetivas de 10X e 40X.

2.3.2 Sedimentação Espontânea

Misturou-se cerca de 2g do material fecal e 2 mL de água destilada que foi filtrada em gaze para um cálice de sedimentação. O material sedimentou por cerca de 1 hora, após o que, o líquido sobrenadante foi desprezado. O sedimento foi novamente ressuspenso em 10 mL de água destilada. Este procedimento foi repetido por 2 vezes. Após a última lavagem, transferiu-se 1 gota do sedimento para uma lâmina seguida de coloração pelo Lugol. A amostra foi analisada sob microscopia de luz utilizando objetivas de 10X e 40X.

2.4 PESQUISA DE COPROANTÍGENOS

O kit ELISA (Wampole®) utilizado neste estudo foi desenvolvido para detecção de *E.histolytica* em amostras fecais. O teste baseia-se na detecção da adesina (lectina inibidora da N-acetil-D-galactosamina) presente na membrana do parasito e responsável pela mediação da ligação do trofozoíto a membrana do intestino.

Os testes foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras fecais foram colocadas em placas sensibilizadas com

anticorpos policlonais que se liga a adesina, seguida da adição de um conjugado com peroxidase específico para a adesina da *E.histolytica* e incubados a temperatura ambiente por duas horas. Foram efetuadas quatro lavagens com solução 20x (solução salina, detergente e 0,2% timerosal), utilizando a lavadora de placas Thermo Plate®, para a retirada de qualquer material não aderido. A revelação foi feita com a adição do substrato enzimático (tetrametilbenzidina e peróxido) que desenvolve cor na presença do complexo enzima-anticorpo-antígeno que se formam na presença da adesina. A densidade ótica foi medida em espectrofotômetro (Bioplus – Bio 2000®) com comprimento de onda de 450nm.

2.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

2.5.1 Extração do DNA

O DNA total foi extraído a partir de amostras fecais utilizando o *kit* comercial QiAmp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN®).

Foi adicionada 0,5 mL de tampão ASL a aproximadamente 0,2g de fezes (ou 200µl em fezes diarréicas), a mistura foi homogeneizada no vórtex por 15 segundos e incubada a 70 °C por 5 minutos. A mistura foi centrifugada a 14.500 rpm e 1,2 mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga estéril. Um tablete de Inhibitex® foi adicionado, sendo o tubo novamente homogeneizado ao vórtex por um minuto. A amostra foi incubada à temperatura ambiente por um minuto e centrifugada a 14.500 rpm pelo mesmo período. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo estéril e este centrifugado a 14.500 rpm por três minutos. A um novo tubo, foi adicionado 15

μL de Proteinase K, 200 μL do sobrenadante e 200 μL do tampão AL. Esta mistura foi homogeneizada ao vórtex por 15 segundos. A amostra foi incubada a 70 °C por 10 minutos e em seguida adicionado 200 μL de etanol 95% e homogeneizado no vórtex por 15 segundos. A amostra foi adicionada à coluna acoplada a um tubo coletor (disponível no *kit*), sendo então centrifugada a 14.500 rpm por um minuto. O filtrado foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo coletor. Foi adicionado 500 μL de tampão AW1 à coluna e esta centrifugada a 14.500 rpm por um minuto, então 500 μL de tampão AW2 foi adicionado a coluna e esta centrifugada a 14.500 rpm por três minutos. Esta última etapa foi repetida e 50 μL do tampão AE foi adicionado à coluna e incubado por um minuto à temperatura ambiente. O tubo foi novamente centrifugado a 14.500 rpm por um minuto, a coluna descartada e o DNA eluído armazenado a -4°C .

2.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para Identificação de Espécie

A PCR utilizada neste estudo foi a técnica de Blessmann *et al.* (2002) modificada por Silva (2005). A temperatura de hibridização foi adaptada para 55°C ao invés de 58°C e o número de ciclos reduzido para 30.

A seqüência-alvo estudada foi a seqüência de 310 pb presente no epissomo que contém o DNAr. Na PCR foram utilizados três iniciadores (Invitrogen) (Blessmann *et al.*, 2002): um específico para *E. histolytica* (Eh-S26C), um para *E. dispar* (Ed-27C) e um (Eh/Ed-AS25) compartilhado por

ambas as espécies (tabela 1). As amostras de DNA foram testadas de modo independente para cada par de iniciador.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados na amplificação do fragmento de 310 pb do DNAr epissomal de *E. histolytica* e *E. dispar* (Blessmann *et al.*, 2002).

Oligonucleotídios	1.1 Sequência
Eh-S26C	5'-GTA CAA AAT GGC CAA TTC ATT CAA CG-3'
Eh/Ed-AS25	5'-GAA TTG ATT TTA CTC AAC TCT AGA G-3'
Ed-27C	5'-GTA CAA AGT GGC CAA TTT ATG TAA GCA-3'

A reação de amplificação foi composta por: tampão Tris-HCl 10 mM pH 9,0, MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 mM de dNTPs, 5 pmoles de cada iniciador, 0,1 U de *Taq* DNA polimerase (Promega)®, 20 ng de DNA e água Milli-Q q.s.p. estéril para um volume final de 10 µL. Essa mistura foi submetida a 30 ciclos de amplificação com as seguintes temperaturas e tempo: 1) desnaturação = 94°C por 1 minuto, 2) hibridização = 55°C por 1 minuto e 30 segundos e 3) extensão = 72°C por 2 minutos e um ciclo final de extensão a 72°C por 7 minutos.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,8% por 1 hora a 100 V em tampão Tris-EDTA-Ácido Bórico (1 X). Os resultados foram visualizados em transiluminador UV após coloração com brometo de etídio. O tamanho dos fragmentos foi comparado ao marcador molecular de 100 pb (Promega)®.

2.6 ANÁLISE DOS DADOS

A frequência da infecção por *E. histolytica* nos métodos parasitológico, pesquisa de antígenos e molecular e frequência dos demais parasitos e análise das variáveis epidemiológicas foi obtida por contagem direta e a significância estatística calculada pelo teste do Qui-Quadrado (χ^2) adotando nível de significância de 5% utilizando o programa BioEstat versão 4.0 (Ayres *et al.*, 2005). A sensibilidade, a especificidade do método coproscópico em relação ao ELISA e da PCR em relação ao ELISA foram calculados utilizando-se o *Screening Test* como teste estatístico. A correlação entre parasitismo e faixa etária e parasitismo e gênero foram calculadas pelo mesmo programa utilizando-se o teste *Odds Ratio* (Razão de Chances) e intervalo de confiança de 95%.

3 RESULTADOS

3.1 AMOSTRA.

A amostra foi composta por 188 indivíduos, dos quais 123 correspondiam a indivíduos pertencentes a faixa etária de 0 - 14 anos (grupo 1) e 65 acima de 14 anos (15 a 85 anos - grupo 2).

3.2 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DA *E. histolytica/E. dispar*.

As 188 amostras foram analisadas quanto à presença de parasitos intestinais a partir do uso de métodos parasitológicos de fezes.

Foi encontrada infecção por *E. histolytica/E. dispar* em 27/188 (14,36%), das quais 14 pertenciam a pacientes do grupo 1 e 13 do grupo 2. A presença da infecção por *E. histolytica/E. dispar* foi maior no grupo 1 (7,45%) que no grupo 2 (6,91%), porém sem significância estatística ($p = 0,1090 / p > 0,05$ - Qui-quadrado) (Tabela 2).

Tabela 2 – Prevalência de *E.histolytica/E.dispar* utilizando métodos parasitológicos (direto e sedimentação espontânea) nas 188 amostras.

Município de Juruti – Pa.

Faixa Etária	Positivo	Negativo	Total
0 - 14 anos	14	109	123
Acima de 14 anos	13	52	65
Total	27	161	188

3.3 DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO DA *E. histolytica*.

Utilizando-se o kit para detecção de coproantígenos de *E. histolytica*, obteve-se positividade em 28 das 188 amostras testadas, representando um percentual de 14,89%. A presença da infecção por *E. histolytica* foi maior no grupo 2 (18,46%) que no grupo 1 (13,00%), porém sem significância estatística ($p = 0,3178 / p > 0,05$ - Qui-quadrado) (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultado dos testes de ELISA (Wampole®) nas 188 amostras do município de Juruti – Pa.

Faixa Etária	Positivo	Negativo	Total
0 - 14 anos	16	107	123
Acima de 14 anos	12	53	65
Total	28	160	188

3.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA *E. histolytica* E DA *E. dispar*.

Devido a fatores orçamentários, o DNA foi extraído de apenas 51 amostras fecais de pacientes assintomáticos (15,69% - 8/51) e portadores de sintomatologia característica de infecção por *E. histolytica* (84,31% - 43/51) sendo investigadas quanto à caracterização de espécie. Apenas 3 (5,88%) amostras foram identificadas e as demais não apresentaram produtos de amplificação nesta técnica. As três (100%) foram caracterizadas como *E. histolytica* e nenhuma amostra amplificou para *E. dispar*.

Das 51 amostras testadas, 7 foram discordantes quanto ao resultado do parasitológico e da PCR e 5 foram discordantes quanto aos resultados do ELISA e da PCR. A amostra J-52 foi discordante, sendo negativa

no ELISA e amplificando como *E. histolytica* na PCR e a amostra J-57 foi positiva no parasitológico e ELISA e negativa na PCR (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultados dos métodos parasitológicos, ELISA e PCR e presença ou ausência de sintomas característicos de infecção por *E.histolytica* em 51 amostras fecais do município de Juruti – Pa.

Reg	Sintomatologia	Parasitológico	ELISA	PCR
J- 01	Pr	N	N	N
J- 02	Pr	N	N	N
J- 03	Pr	N	P	<i>E.histolytica</i>
J- 04	Pr	N	N	N
J- 05	Pr	N	N	N
J- 06	A	N	N	N
J- 07	Pr	<i>E.histolytica/E.dispar</i>	P	N
J- 08	Pr	N	N	N
J- 09	Pr	N	P	<i>E.histolytica</i>
J- 11	A	N	N	N
J- 12	Pr	N	N	N
J- 15	Pr	N	N	N
J- 16	Pr	N	N	N
J- 17	A	<i>E.histolytica/E.dispar</i>	N	N
J- 19	Pr	N	N	N
J- 21	Pr	N	N	N
J- 22	A	N	N	N
J- 23	Pr	N	N	N
J- 26	Pr	N	N	N
J- 27	Pr	N	N	N
J- 28	Pr	N	N	N
J- 29	Pr	N	N	N
J- 30	A	N	N	N
J- 32	Pr	N	N	N
J- 33	Pr	N	N	N
J- 34	Pr	N	N	N
J- 36	Pr	<i>E.histolytica/E.dispar</i>	N	N
J- 39	Pr	N	N	N
J- 40	Pr	N	N	N
J- 41	Pr	N	N	N
J- 42	Pr	N	P	N
J- 48	Pr	N	N	N
J- 49	Pr	N	N	N
J- 51	Pr	N	N	N

Tabela 4 – Resultados dos métodos parasitológicos, ELISA e PCR e presença ou ausência de sintomas característicos de infecção por *E.histolytica* em 51 amostras fecais do município de Juruti – Pa (continuação).

Reg	Sintomatologia	Parasitológico	ELISA	PCR
J- 52	Pr	N	N	<i>E.histolytica</i>
J- 53	Pr	N	N	N
J- 54	Pr	N	N	N
J- 56	Pr	N	N	N
J- 57	Pr	<i>E.histolytica/E.dispar</i>	P	N
J- 59	Pr	N	N	N
J- 60	Pr	N	P	N
J- 63	Pr	N	N	N
J- 64	A	N	N	N
J- 65	A	N	N	N
J- 67	A	N	N	N
J- 68	Pr	N	N	N
J- 69	Pr	N	N	N
J- 70	Pr	N	N	N
J- 72	Pr	N	N	N
J- 73	Pr	N	N	N
J-74	Pr	N	N	N

Pr - presença de sintomas (diarréia, dor abdominal e/ou vômitos); A – ausência de sintomas; P – positivo e N – negativo.

3.5 NÍVEL DE CONCORDÂNCIA DOS TESTES COPROSCÓPICOS E DE ELISA.

Quando comparamos os resultados das 188 amostras analisadas por ambos os métodos (ELISA e coproscópicos), 41 (21,81%) foram discordantes quanto aos resultados tendo ocorrido maior número de positivos no teste ELISA. Do total de amostras testadas, 7 foram positivas no método ELISA e coproscópico (E+C+), 20 (C+E-), 21 (C-E+) e 140 (C-E-) (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados dos testes coproscópicos e ELISA (*E. histolytica* II. Wampole®) em 188 amostras testadas.

Faixa Etária	C+/ E+	C+/ E-	C-/ E+	C-/ E-	Total
0 - 14 anos	2	12	14	95	123
Acima de 14 anos	5	8	7	45	65
Total	7	20	21	140	188

A sensibilidade e a especificidade do coproscópio quando comparadas ao teste ELISA foram 25% e 87,50% respectivamente.

3.6 NÍVEL DE CONCORDÂNCIA DA PCR E DO ELISA.

Quando comparamos os resultados das 51 amostras analisadas por ambos os métodos (ELISA e PCR), 5 (9,80%) foram discordantes quanto aos resultados tendo ocorrido maior número de positivos no teste ELISA. Do total de amostras testadas, 2 foram positivas no método ELISA e PCR (E+P+), 1 (P+E-), 4 (P-E+) e 44 (P-E-) (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados dos testes ELISA (*E. histolytica* II. Wampole®) e PCR em 51 amostras testadas.

	P+/ E+	P+/ E-	P-/ E+	P-/ E-	TOTAL
0 - 14 anos	1	0	0	19	20
Acima de 14 anos	1	1	4	25	31
Total	2	1	4	44	51

A sensibilidade e a especificidade da PCR quando comparadas ao teste ELISA foram 33,33% e 97,78% respectivamente.

3.7 RELAÇÃO QUADRO CLÍNICO E PRESENÇA DO PARASITO.

Dos 188 pacientes entrevistados quanto à presença de sintomas relacionados à presença de infecção por *E.histolytica*, 31,38% (59/188) relataram ausência de sintomas no momento da obtenção da amostra de fezes e 68,62% (129/188) relataram um ou mais sintomas. Houve predomínio de diarreia (68,62%) e dor abdominal (49,47%).

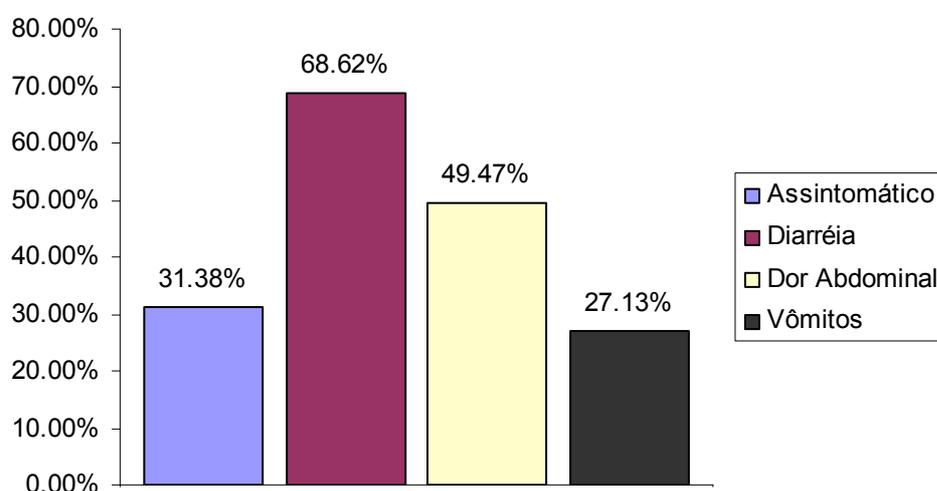


Figura 6 – Distribuição de sintomas declarados pelos pacientes durante a entrevista, sugestivos de amebíase intestinal.

Do total de pacientes sintomáticos, 13,18% (17/129) apresentaram positividade no ELISA e 86,82% (112/129) foram negativos. Entre os assintomáticos, a positividade foi de 18,64% (11/59) (Tabela 7).

Tabela 7 - Relação entre os resultados do ELISA e a presença ou não de sintomas sugestivos de amebíase intestinal em 188 pacientes.

Resultado do ELISA	Sintomático *	Assintomático	Total
ELISA +	17	11	28
ELISA -	112	48	160
Total	129	59	188

* presença de sintomas (diarréia, dor abdominal e vômitos)

A análise estatística não mostrou significância estatística entre a presença do parasito no ELISA e os sintomas clínicos ($p=0,3287 / p > 0,05$ – Qui- quadrado).

Tabela 8 - Relação entre os resultados do parasitológico e a presença ou não de sintomas de parasitose intestinal em 188 pacientes.

Resultado do Parasitológico	Sintomático *	Assintomático	Total
Positivo	54	28	82
Negativo	75	31	106
Total	129	59	188

* presença de sintomas (diarréia, dor abdominal e vômitos)

A análise estatística não mostrou significância estatística entre a presença do parasito e os sintomas clínicos ($p=0,4727 / p > 0,05$ – Qui- quadrado).

Tabela 9 - Relação entre os resultados da PCR e a presença ou não de sintomas sugestivos de amebíase intestinal em 51 pacientes.

Resultado da PCR	Sintomático *	Assintomático	Total
PCR +	3	0	3
PCR -	40	8	48
Total	43	8	51

* presença de sintomas (diarréia, dor abdominal e vômitos)

A análise estatística não mostrou significância estatística entre a presença do parasito na PCR e os sintomas clínicos ($p=0,4413$ / $p > 0,05$ – Qui- quadrado).

3.8 PREVALÊNCIA DE PARASITOSES INTESTINAIS NO MUNICÍPIO DE JURUTI, PARÁ.

Das 188 amostras analisadas pelos métodos coproscópicos (direto e sedimentação espontânea), 43,62% (82/188) estavam parasitadas.

O parasito mais comum nas duas faixas etárias foi o *Blastocystis hominis* que apresentou uma prevalência de 22,87% (43/188), seguido pela *E. histolytica/E. dispar* em 27/188(14,36%) (tabela 8).

Tabela 10 – Prevalência de parasitos intestinais nas 188 amostras utilizando métodos coproscópicos (direto e sedimentação espontânea), Município de Juruti – Pa.

Parasito	0 - 14 anos	Acima de 14 anos	Total	%
<i>Blastocystis hominis</i>	29	14	43	22,87%
<i>E.histolytica/E.dispar</i>	14	13	27	14,36%
<i>Entamoeba coli</i>	14	10	24	12,77%
<i>Endolimax nana</i>	14	7	21	11,17%
<i>Giardia lamblia</i>	14	2	16	8,51%
<i>Ancilostomideo</i>	2	10	12	6,38%
<i>Ascaris lumbricoides</i>	7	4	11	5,85%
<i>Hymenolepis nana</i>	2	1	3	1,60%
<i>Iodameba butschlii</i>	1	2	3	1,60%
<i>Trichuris trichiura</i>	2	1	3	1,60%
<i>Enterobius vermiculares</i>	2	0	2	1,06%
<i>Strongyloides stercoralis</i>	0	1	1	0,53%

Dentre os indivíduos parasitados, 62,20% (51/82) eram do gênero masculino e 37,80% (31/82) do gênero feminino de ambas as faixas etárias.

A correlação entre o gênero e parasitismo intestinal foi estatisticamente significativa. (OR = 2,0652; IC = 1,1467 – 3,7193; $p = 0,0224$ / $p < 0,05$ – Odds Ratio). Com maior significância no gênero masculino (Tabela 9).

Tabela 11 – Distribuição dos pacientes portadores de parasitos intestinais de acordo com o gênero. Município de Juruti – Pa.

Gênero	Portador de Enteroparasitos	Não Portador de Enteroparasitos	Total
Masculino	51	47	98
Feminino	31	59	90
Total	82	106	188

A correlação entre a faixa etária e a parasitismo intestinal não foi estatisticamente significativa. (OR = 0,6421; IC = 0,3504 – 1,1766; $p = 0,1995$ / $p > 0,05$ – Odds Ratio) (Tabela 10).

Tabela 12 – Distribuição dos pacientes portadores de parasitos intestinais de acordo com a faixa etária. Município de Juruti – Pa.

Faixa Etária	Portador de Enteroparasitos	Não Portador de Enteroparasitos	Total
0 - 14 anos	49	74	123
Acima de 14 anos	33	32	65
Total	82	106	188

4 DISCUSSÃO

Na região Amazônica, encontramos locais isolados geograficamente em virtude da dispersão demográfica e das dificuldades de transporte, onde as precárias condições sócio-econômicas formam um grupo social que apresenta clara demanda por atenção à saúde. O município de Juruti possui sua economia baseada na subsistência, tendo como principal produto a farinha de mandioca e a pesca. A água apresenta-se como importante veículo de disseminação de doenças endêmicas.

4.1 PREVALÊNCIA DE *E.histolytica*

O protozoário *E.histolytica* é endêmico nesta região e é considerado responsável por milhares de casos de diarreia e abscesso no fígado a cada ano (Salles, *et al.*, 2003), o que mostra que a amebíase deve ser considerada um importante problema de saúde pública em nossa região.

A prevalência da amebíase nas diversas regiões do Brasil é muito variável. Na região sul, Schnack *et al.* (2001) encontraram prevalência de 56,4% para *E. histolytica/E. dispar* em Criciúma, Santa Catarina, porém Quadros *et al.* (2004) analisando amostras do mesmo Estado, observaram prevalência de 2,5% para *E. histolytica/E. dispar* na cidade de Lages. No centro-oeste, Aguiar *et al.* (2007) observaram prevalência de 31,6% *E. histolytica/E. dispar* em uma amostra do estado do Mato Grosso do Sul. Na região nordeste, Braga *et al.* (2001) encontraram prevalência de 14,9% para *E. histolytica* em uma amostra de Fortaleza, Ceará. Todavia, Dourado *et al.* (2006) estudaram 213 amostras de pacientes de Recife, Pernambuco utilizando um

ELISA e não observaram nenhuma infecção por *E.histolytica*. Concluíram que em Pernambuco, a *E.dispar* é a espécie predominante, o que corrobora com os dados de Pinheiro *et al.* (2004) que utilizando uma PCR observaram prevalência de 74,19% (23/31) de *E.dispar* e nenhuma amostra positiva para *E.histolytica* na cidade de Macaparana, Pernambuco. Na região norte, Póvoa *et al.* (2000) identificaram prevalência de 28,99% de *E. histolytica* em uma amostra do Estado do Pará. Benetton *et al.* (2005) verificaram prevalência de 6,8% de *E.histolytica* em uma amostra de Manaus, Amazonas. Estes dados demonstram a diferença da distribuição geográfica da doença no Brasil, com predomínio de formas patogênicas em algumas regiões e formas não patogênicas em outras.

Mais recentemente, Barnawi *et al.* (2007) analisaram 186 amostras fecais de pacientes provenientes da cidade de Jeddah, Arábia Saudita, observaram prevalência de 31,3% para o complexo *E.histolytica/E.dispar* utilizando métodos coproscópicos e 2,7% utilizando um ELISA para pesquisa de coproantígenos.

A prevalência em nosso estudo foi de 14,89% tanto o ELISA como método ouro. As discordâncias apresentadas (21,81%), a incapacidade de diferenciação entre a forma patogênica (*E.histolytica*) e a não patogênica (*E.dispar*) e a incapacidade de detectar o parasita rompido, sugere que a microscopia deva ser revista como um método de diagnóstico da amebíase em nossa região.

4.2 COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO

Tradicionalmente, a detecção laboratorial de *E.histolytica* em fezes humanas tem contado com o exame microscópico a fresco. Por outro lado, a identificação da *E.dispar* como espécie separada e não patogênica, necessita de métodos de detecção alternativos que possam levar a diferenciação entre os dois organismos. Neste estudo, comparamos a prevalência da infecção por *E.histolytica* utilizando métodos coproscópicos (direto e sedimentação espontânea), imunológicos (ELISA) e de biologia molecular (PCR), a fim de verificar a importância do emprego de métodos mais específicos e sensíveis em estudos epidemiológicos.

Os resultados mostraram positividade de 14,36% (27/188) para os métodos coproscópicos e de 14,89% (28/188) para o ELISA, com 21,81% (41/188) de resultados discordantes, resultando em uma sensibilidade de 25% e especificidade de 87,50% do método coproscópico em relação ao ELISA. O que corrobora com os dados de Nesbitt *et. al.* (2004) que observaram uma sensibilidade de 39% e especificidade de 96% e Silva (2005) que observou uma sensibilidade de 45,26% e especificidade de 87,03% de métodos coproscópicos em relação ao ELISA.

A amplificação dos fragmentos de DNA por PCR tem sido comprovada como um método sensível e específico para detectar *E.histolytica* ou *E.dispar* a partir de fezes humanas (Acuña-Soto *et al.*, 1993; Nunes *et al.*, 2001).

O diagnóstico pelo método de PCR apresentou uma positividade de apenas 5,88% (3/51) para *E.histolytica*, não apresentando positividade para

E.dispar e infecções mistas. Este dado nos permite supor que na cidade de Juruti a *E.histolytica* é a espécie predominante em comparação a *E.dispar*. A positividade da PCR foi inferior a observada na microscopia (14,36%) e teste de ELISA (14,89%).

Em hospitais da Etiópia, Kebede *et al.* (2004) analisando 108 amostras fecais e observaram apenas 1 amostra (0,92%) positiva para *E.histolytica* e 77 (71,33%) para *E.dispar*. Na faixa de Gaza, Palestina, Al-Hindi *et al.* (2005) observaram prevalência de 69,6% de *E.histolytica*, de 22,8% para *E.dispar* e de 7,6% de infecções mistas, utilizando PCR. Já Calderaro *et al.* (2006) realizando estudo epidemiológico em uma área não endêmica para amebíase na cidade de Parma, Itália encontraram 8,3% de pacientes infectados com *E.dispar* e 5,6% de infecção por *E.histolytica* utilizando PCR convencional e PCR em tempo real para diferenciação das espécies. Em um instituto psiquiátrico de Malina, Filipinas, Rivera *et al.* (2006) analisando 113 amostras fecais identificaram infecções por *E.dispar* e *E.histolytica* em 65,48% e 5,30% dos pacientes, respectivamente. Mais recentemente, Nohynková *et al.* (2007) detectaram 3 casos (4,4%) de infecção por *E.histolytica* em 68 amostras de pacientes residentes da República Tcheca por meio de PCR.

Nossos resultados reforçam os dados acima sobre a prevalência de infecção por *E.histolytica* utilizando a biologia molecular para diagnóstico. Todavia, contradiz os resultados de Acuña-Soto *et al.* (1993) e Silva (2005) que utilizando amostras proveniente de culturas, observaram uma grande quantidade de infecções mistas, 56% e 56,5% respectivamente.

Quatro amostras não amplificaram na PCR apesar de terem sido positivas no ELISA. A presença de inibidores da PCR em amostras fecais bem como substâncias capazes de degradar o DNA pode influenciar na desempenho de técnicas moleculares (Furrows *et al.*, 2004). O baixo rendimento na extração do DNA e interferência de DNA de outros organismos também poderia contribuir para os baixos resultados (Vianna, 2006).

Diversos protocolos de extração estão sendo utilizados na obtenção de DNA fecal (Aguirre *et al.*, 1997; Viana *et al.*, 2003). Neste estudo, a extração de DNA fecal foi feita utilizando um kit comercial (QIAamp® DNA Stool Mini Kit – Qiagen®). Vários estudos observaram que a extração de DNA a partir da cultura do parasito é mais eficiente quando comparada à extração através de amostras fecais, já que possibilita uma maior concentração do parasito (Zaki & Clark, 2001 e Pinheiro *et al.*, 2004). Estes dados corroboram com Silva (2005) que concluiu que a extração do DNA a partir da cultura do parasito mostrou-se como a técnica de escolha.

O ELISA foi mais sensível na detecção de *E.histolytica* que a PCR, resultado contraditório aos observados por vários autores (Mirelman *et al.*, 1997; Gonin & Trudel, 2003 e Al-Hindi *et al.*, 2005) e que corrobora com Samie *et al.* (2006), que analisando amostras fecais de pacientes da África do Sul, observaram prevalência de *E.histolytica* de 18,8% utilizando um ELISA e de 2,1% utilizando uma PCR.

A PCR é técnica laboriosa e de custo elevado, quando comparada ao kit de ELISA. Este último além do custo menor possui uma boa correlação clínica, reduz o tempo de execução dos testes, é de fácil manuseio e produz

resultados satisfatórios. Estes argumentos favorecem o emprego desta técnica no diagnóstico confirmatório da amebíase em nossa região.

4.3 RELAÇÃO ENTRE QUADRO CLÍNICO E PRESENÇA DO PARASITO

Não foi observada uma relação estatisticamente significativa entre a presença do parasito no método ELISA (teste ouro) e a presença de sintomas. Os principais sintomas que acometeram os indivíduos estudados foram a diarreia (68,62%) e a dor abdominal (49,47%).

El-Kadi *et al.* (2006) analisaram 115 pacientes com diarreia na cidade do Cairo, Egito e observaram que apenas 3 (2,6%) estavam infectados com *E.histolytica*. Todavia, Paniaguara *et al.* (2007) analisaram 300 amostras diarreicas de crianças na cidade do México e observaram prevalência de 70,3% de infecção por *E.histolytica/E.dispar*. Observamos que as cepas circulantes nestes dois países possuem potencial patogênico diferenciado.

A presença de casos assintomáticos (18,64%, 11/59), porém ELISA positivo corrobora com os dados de Guerrant (1986), Denis & Chadee (1988) e Ramos *et al.* (2001) que relatam que alguns indivíduos infectados com *E. histolytica* não manifestam sintomas da doença. É importante informar, que os pacientes ELISA positivo não foram acompanhados clinicamente após o diagnóstico, impossibilitando afirmar que os mesmos não desenvolveram a sintomatologia característica da doença.

Blessmann *et al.* (2003) estudaram 383 indivíduos da do Vietnam e observaram prevalência de 11,2% de infecção por *E.histolytica* utilizando um

PCR, sendo que nenhum dos indivíduos estudados apresentou qualquer sintoma característico de amebíase invasiva.

4.4 PREVALÊNCIA DE PARASITÓSES INTESTINAIS

A correlação entre parasitismo intestinal e gênero mostrou-se estatisticamente significativa ($p = 0,0224$) com predomínio no gênero masculino. Este dado nos permite supor que na cidade de Juruti homens e mulheres estão expostos a diferentes fatores de risco para infecção parasitária intestinal.

De acordo com a distribuição de enteroparasitoses por idade, observou-se que na cidade de Juruti a taxa de maior prevalência ocorreu na faixa etária de acima de 14 anos (50,77% 33/65), o que contradiz os estudos de Coura *et al.* (1994), Braga *et al.* (2001) e Esteves (2005) que evidenciaram maior frequência nas faixas etárias menores. Por sua vez, corroboram com os dados de Kobayashi *et al.* (1995), que notaram maior positividade em pacientes maiores de 16 anos. Todavia, a diferença entre os dois grupos etários estudados não foi estatisticamente significativa, o que demonstra que o risco de transmissão independe da idade.

A presença de outros parasitos na amostra estudada, em alta frequência, associada as precária condições sanitárias do município e a expansão populacional da cidade, demonstram que a amebíase pode tornar-se um problema de saúde pública no futuro.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo concluímos que:

- A prevalência *E.histolytica* na comunidade estudada não foi elevada independente do método utilizado.
- A positividade (18,64%) para *E.histolytica* em pacientes assintomáticos, maior que a observada em sintomáticos (13,18%) sugere que as cepas circulantes não possuem potencial patogênico elevado;
- A PCR utilizada neste estudo mostrou menor sensibilidade na detecção de *E. histolytica* que o método de ELISA;
- A sensibilidade do método ELISA mostra a importância do seu emprego nos estudos epidemiológicos em nossa região;
- A presença de outros parasitos na amostra estudada, em alta frequência, associada as precária condições sanitárias do município e a expansão populacional da cidade, demonstram que a amebíase pode tornar-se um problema de saúde pública no futuro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ALLA, M.D., JACKSON, T.F., 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**, **38**: 2344-2347, 2000.

ACUÑA-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 non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **48**:58-70, 1993.

AGUIAR, J.I., GONÇALVES, A.Q., SODRÉ, F.C., PEREIRA, S. R., BÓIA, M.N., DE LEMOS, E.R., DAHER, R.R. Intestinal protozoa and helminths among Terena Indians in the State of Mato Grosso do Sul: high prevalence of *Blastocystis hominis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **40(6)**:631-634, 2007.

AGUIRRE, A., MOLINA, S., BLOTKAMP, C., VERVEIJ, J., VINUESA, T., VALLS, M.E., GUHL, F., POLDERMAN, A., JIMENEZ DE ANTA, M.T., GONZALEZ-RUIZ, A., FRAME, I.A., WARHURST, D.C. Diagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in clinical specimens by PCR-SHELA. **Archives of Medical Research**, **28**:282-284, 1997.

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

AL-HINDI, A, SHUBAIR, M.E., MARSHALL, I., ASHFORD, R.W., SHARIF, F.A., ABED. A.A., KAMEL, E.G. *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar* among children in Gaza, Gaza Strip. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, **35(1)**:59-68, 2005.

ARAUJO, C.F., FERNÁNDEZ, C.L. Prevalência de parasitoses intestinais na cidade de Eirunepé, Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **38**: 69, 2005.

AYRES, M., AYRES JR., M., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. **BioEstat: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Sociedade Civil Mamirauá e MCT-CNPq (Eds.), Belém, 2005, 334 pp.

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**, **37(1)**:143-150, 2007.

BENETON, M.L.F.N. **Estudo epidemiológico para identificação de fatores de risco para amebíase na cidade de Manaus- Amazonas.** Tese de Doutorado em Ciências – Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.

BENETTON, M.L.F.N., GONÇALVES, A.V.; MENECHINI, 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**, **99(7)**:532-540, 2005.

BLESSMANN J., BUSS H., NU, P.A., DINH, B.T., NGO, Q.T., VAN, A.L., ALLA, M.D., JACKSON, T.F., RAVDIN, J.I., TANNICH, E. Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. **Journal of Clinical Microbiology**, **40**:4413-4417, 2002.

BLESSMANN, J., ALI, I.K., NU, P.A., DINH, B.T., VIET, T.Q., VAN, A.L., CLARK, C.G., TANNICH, E. Longitudinal study of intestinal *Entamoeba histolytica* infections in asymptomatic adult carriers. **Journal of Clinical Microbiology**, **41**:4745-50, 2003

BRAGA, L.L.B.C., GOMES, M.L., SILVA, M.W., PAIVA, C., SALES, A., MANN, B.J. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections as detected by monoclonal antibody in an urban slum in Fortaleza, Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **34(5)**:467-471, 2001.

BRUCKNER, D. A. Amebiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, **5**: 356-369, 1992.

CABALLERO-SALCEDO, A., VIVEROS-ROGEL, M., SALVATIERRA, B., TAPIA-CONYER, R., SEPÚLVEDA-AMOR, J., GUTIÉRREZ, G., ORTIZ-ORTIZ, L. Serumepidemiology of amebiasis in México. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **50**: 412-419, 1994.

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**, **100(5)**:450-457, 2006.

CHAVES, C.L. **Abscesso amebiano do fígado**. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Gastroenterológica) - Rio de Janeiro Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1987.

CLARK, C.G. Amoebic disease: *Entamoeba dispar*, na organism reborn. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Meeting at Manson House, London, 19 February 1998. **Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 92**: 361-364, 1998.

COURA, J.R., WILLCOX, H.P.F., TAVARES, A.M. Aspectos epidemiológicos, sociais e sanitários de uma área do Rio Negro, estado do Amazonas, com especial referência às parasitoses intestinais e à infecção chagásica. **Caderno de Saúde Pública, 10**: 327-336, 1994.

CUNHA, A. **Patogenia da amebíase**. Tese de Concurso para Professor Titular, Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais, 1975.

DELIALIOGLU, N., ASLAN, G., SOZEN, M., BABUR C., KANIK A., EMEKDAS G. Detection of *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* in stool specimens by using enzyme-linked immunosorbent assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 7 (9)**: 769-772, 2004.

DENIS, M., CHADEE, K. Immunopathology of *Entamoeba histolytica* infections. **Parasitology Today, 4** : 247-254, 1988.

DIAMOND, L. CLARK, C.G. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, **40**: 340-344, 1993.

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**, **39(4)**:388-389, 2006.

EL-KADI, M.A., DORRAH, A.O., SHOUKRY, N.M. Patients with gastrointestinal complains due to enteric parasites, with reference to *Entamoeba histolytica/dispar* as detected by ELISA *E. histolytica* adhesion in stool. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, **36(1)**:53-64, 2006.

ESTEVES, N.M.R.S. **Diagnóstico coproparasitológico e avaliação dos fatores de risco para infecção parasitária intestinal em uma comunidade ribeirinha do município de Belém-Pará, Brasil**. Dissertação de mestrado, Belém. Universidade Federal do Pará, 2005.

EVANGELOPOULOS, A. SPANAKOS, G., PATSOULA, E., VAKALIS, N., LEGAKIS, N. A nested multiplex PCR assay for the simultaneous differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces. **American Journal of Tropical Medicine**, **94**: 233-240, 2000.

EVANGELOPOULOS, A., LEGAKIS, N., VAKALIS, N. Microscopy, PCR and ELISA applied to the epidemiology of amebiasis in Greece. **Parasitology International**, **50**: 185-189, 2001.

FERIA-VELASCO, A., GONZALES DEL PIEGA, M., TADIA-ARIZMENDI, G. Comparative study of *Entamoeba histolytica* trophozoites by jans of sanning electron microscopy na x-ray dispersive energy spectrometry. In: **Amibiasis**. Sepulveda, B. & Diamond, L.S. (eds). Mexico. Instituto Mexicano del Seguro Social, 1976. p. 210-213.

FURROWS, S.J., MOODY, A.H., CHIODINI, P.L. Comparasion of PCR and antigen detection methods for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. **Journal of Clinical Pathology**, **57**:1264-1266, 2004.

GATHIRAM, V., JACKSON, T.F. A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. **South African Medical Journal**, **72**: 806-807, 1990.

GITLER, C., MIRELMAN, D. Factors contributing to the pathogenic behavior of *Entamoeba histolytica*. **Annual Review of Microbiology**, **40**: 237-261, 1986.

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**, **41**: 237-241, 2003.

GUERRANT, R.L. Amebiasis: introduction, current status and research questions. **Review of Infections Disease**, **8**: 218-227, 1986.

HAQUE, R., NEVILLE, L.M., HAHN, P., PETRI JR., W.A. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. **Journal of Clinical Microbiology**, **33**: 2558-2561, 1995.

HAQUE, R., ALI, I.K.M., AKTHER, S., PETRI JR., W.A. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, **36**: 449-452, 1998.

HEALEY, G.R. Parasitology. *In: Proceedings of a symposium on waterborne transmission of Giardiasis.* (Ed) Environment Protection Agency. Washington D.C., 1978, p: 92-103.

HUSTON, C.D., HAQUE, R., PETRI, W.A. Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica*. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, **22**: 1-11, 1999.

KEBEDE, A., VERWEIJ, J.J., PETROS, B., POLDERMAN, A.M. Short communication: Misleading microscopy in amoebiasis. **Tropical medicine and international health**, **9(5)**:651-652, 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**, **37**:13-18, 1995.

LEIPPE, M., BRUHN, H., HECHT, O., GROTZINGER, J. Ancient weapons: the three-dimensional structure of amoebapore A. **Trends in Parasitology**, **21**: 5-7, 2005.

MARTÍNEZ-BAEZ, M. Introducción histórica. *In*: **Amibiasis**. Martinez-Palomo, A. (ed.) Editorial Medica Panamericana, Bogotá, 1989, p:11-16.

MARTÍNEZ-PALOMO, A. Biología de la *Entamoeba histolytica*. *In*: **Amibiasis**. Martinez-Palomo, A. (ed.) Editorial Medica Panamericana, Bogotá, 1989, p:17-41.

MARTINS, S.J., MENEZES, R.C. Parasitose intestinal entre os índios parakanã. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **27 (Suplemento)**: 332, 1994,

- MIRANDA, R.A., XAVIER, F.B., MENEZES, R.C. Intestinal parasitism in a Parakana indigenous community in southwestern Para State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, **14**:507-511, 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**, **35**:2405-2407, 1997.
- NESBITT, R.A., MOSHA, F.W., KATKI, H.A., ASHRAF, M., ASSENGA, C., LEE, C.M. Amebiasis and comparison of microscopy to ELISA technique in detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. **Journal of National Medical Association**, **96**: 671-677, 2004.
- NOHYNKOVÁ, E., PYSOVÁ, I., TUMOVÁ, P., TOLAROVÁ, V. Pathogenic *Entamoeba histolytica*--a rare incidence in persons microscopically positive for cysts in faeces. **Casopis lekaru ceskych**, **146(2)**:132-136, 2007.
- NUNEZ, Y. O., M. A., FERNANDEZ, D., TORRES-NUNEZ, J. A., SILVA, I., MONTANO, J. L., MAESTRE, 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**, **64**: 293–297, 2001.

- OHNISH, K., MURATA, M. Present characteristics of symptomatic Amebiasis due to *Entamoeba histolytica* in the east-southeast area of Tokyo. **Epidemiology Infections**, **119**: 363-367, 1997.
- PANIAGUA , G.L., MONROY, E., GARCÍA-GONZÁLEZ, O., ALONSO, J., NEGRETE, E., VACA, S. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. **Annual Clinical Microbiology Ant microbiology**; **6**:17, 2007.
- PINHEIRO, S.M.B., CARNEIRO, R.M., ACA, I.S., IRMÃO, J.I., MORAIS JR, M.A., COIMBRA, M.R.M., CARVALHO, 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**, **70**:221-224, 2004.
- PÓVOA, M.M., ARRUDA, J.E., SILVA, M.C., BICHARA, C.N., ESTEVES, P., GABBAY, Y.B., MACHADO, R.L. Diagnosis of intestinal amebiasis using coproscopic and immunological methods in a population sample in greater metropolitan Belem, Para, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, **16**:843-846, 2000.

QUADROS, R.M., MARQUES, S., ARRUDA, A.A.R., DELFES, P.S.W.R., MEDEIROS, I.A.A. Parasitas intestinais em centros de educação infantil municipal de Lages, SC, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **37(5)**: 422-423, 2004.

RAMOS, F., MORÁN, P., GONZÁLEZ, E., GARCIA, G., RAMIRO, M., GOMEZ, A., DE LEÓN, M.D.C.G., MELENDRO, E. J, VALADEZ, A., XIMENEZ, C. High prevalence rate of *Entamoeba histolytica* asymptomatic infection in a rural Mexican community. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **73(1)**: 87-91, 2005.

RAVDIN, J.I. Cell biology of *Entamoeba histolytica* and immunology of amebiasis. *In: Amebiasis: Human Infection by Entamoeba histolytica*. Ravdin, J.I. (ed) Editor Hardcover. New York, 1988, p:127-149.

REY, L. *Entamoeba histolytica* e amebíase. *In: Parasitologia*. Ed. Guanabara Koogan, 3 ed., Rio de Janeiro. 2001, p: 287-311.

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

- 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**, **98(2)**:106-110, 2006.
- RODRIGUES FILHO, A., LEITE, J.M., VIANNA, C., ARAÚJO, R., MANESCHY, L., SOARES, E.C. Abscesso amebiano do fígado: Estudo clínico e anátomo-patológico de 13 casos. **Revista de Ciências Biológicas de Belém**, **1**: 163-176, 1963.
- ROMERO, J.L., DESCOTEAUX, S., REED, S., OROZCO, E., SANTOS, J., SAMEULSON, J. Use of polymerase chain reaction and nonradioactive DNA probes to diagnose *Entamoeba histolytica* in clinical samples. **Archives of Medical Research**, **23**:277-279, 1992.
- SALLES, J.M.C., SALLES, M.J.C., SALLES, J.M.C. **Amebíase**. Salles, J.M.C., Salles, M.J.C., Salles, J.M.C. (2 ed.), São Paulo, 1998, 28p.
- SALLES, J.M., MORAES, L.A., SALLES, M.C. Hepatic Amebiasis. **Brazilian Journal of Infections Diseases**, **7**: 96-110, 2003.
- 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**, **75(3)**:565-571, 2006.

SCHNACK, F.J., FONTANA, L.M., BARBOSA, P.R., SILVA, L.S., BAILLARGEON, C.M., BARICHELLO, T., PÓVOA, M.M., CAVASINI, C.E., MACHADO, R.L. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants (< 5 years old) in a population sample in Greater Metropolitan Criciúma, Santa Catarina State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, **19**:1205-1208, 2003.

SILVA, E.B., NETO, L.C., GUERRA, A.L.S., GOMES, G.A.R. Estudo clínico de abscesso hepático em crianças. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **31 (Suplemento)**: 141, 1988.

SILVA, E.F. *Entamoeba histolytica* e Amebíase. In: **Parasitologia Humana**. Neves, D.P., Melo, A.L., Genaro, O., Linardi, P.M. (eds) Atheneu, 1995. p. 133 – 147.

SILVA, M.C.M. **Epidemiologia da amebíase e caracterização bioquímica e molecular de isolados de *Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903) e *Entamoeba dispar* (Brumpt, 1925) do Pará**. Tese de Doutorado, Belém. Universidade Federal do Pará, 2005.

SILVA, M.C.M., MONTEIRO, C.S.P., ARAUJO, 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**, **21 (3)**:969-973, 2005.

TANYUKSEL, M. PETRI, W.A. Laboratory diagnosis of Amebiasis. **Clinical Microbiology**, **16**: 713-729, 2003.

TSUTSUMI, V. Los modelos experimentales *in vivo* em la amibiasis. **Gaceta Médica de México**, **130**: 450-453, 1994.

VAN DOORN, H. R., HOFWEGEN, H., KOELEWIJN, R., GILIS, H., PEEK, R., WETSTEYN, J.C.F.M., VAN GENDEREN, P.J.J., VERVOORT, T., VAN GOOL, T. Use of rapid dipstick and latex agglutination tests and enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of amebic liver abscess, amebic colitis, and *Entamoeba histolytica* cyst passage. **Journal of Clinical Microbiology**, **43**: 4801-4806, 2005.

VERWEIJ, J.J., BLOTKAMP, J., BRIENEN, E.A., AGUIRRE, A., POLDERMAN, A.M. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* cysts using polymerase chain reaction on DNA isolated from faeces with spin columns. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, **19**: 358-361, 2000.

VERWEIJ, J.J., BLANGÉ, R.A., TEMPLETON, K., SCHINKEL, J., BRIENEN, E.A.T., VAN ROOYEN, M.A.A., VAN LIESHOUT, L., POLDERMAN, A.M. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, **42**: 1220-1223, 2004.

VIANNA, E.N., BENNETON, M.L.F.N., SILVA, M.C.M., FREITAS, M.A.R., SILVA, E.F., GOMES, M.A. Standardization to identify cysts of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* from fecal specimens. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **45(Suplemento 13)**:168, 2003.

VIANNA, E.N. **Avaliação da técnica de PCR no diagnóstico diferencial entre *E.histolytica* e *E.dispar* em amostras fecais provenientes de pacientes brasileiros.** Dissertação de Mestrado, Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

WALDERICH, B., WEBER, A., KNOBLOCH, J. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from German travelers and residents of endemic regions. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **57**: 70-74, 1997.

WALSH, J.A. Problems in recognition and diagnosis of Amebiasis, estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. **Revised Infection Disease**, **8**: 228, 1986.

WEINKE, T., FRIEDRICH-JANICKE, B., HOPP, P., JANITSCHKE, K.
Prevalence and clinical importance of *Entamoeba histolytica* in two high-risk groups: travelers returning from the tropics and male homosexuals. **Journal of Infections Diseases**, **161**: 1029-1031, 1989.

WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation of experts on amebiasis. Proceeding of the XIII Seminar on Amebiasis. **Archives of Medical Research**, **28 (Special Issue)**. 1997.

ZAKI, M., CLARK, C.G. Isolation and characterization of polymorphic DNA from *Entamoeba histolytica*. **Journal of Clinical Microbiology**, **39**:897-905, 2001.

ZAKI, M., MEELU, P., SUN, W., CLARK, C.G. Simultaneous differentiation and typing of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. **Journal of Clinical Microbiology**, **40**:1271-1276, 2002.



Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Por favor, leia as informações e discuta com quem desejar. Pergunte-nos se houver algo que não esteja claro ou caso queira mais informações.

Saúde no município de Juruti, Pará: cenário atual, desafios e possibilidades

Coordenadoras do Projeto: Dras. Lourdes Maria Garcez e Marinete Marins Póvoa - Instituto Evandro Chagas (Seção de Parasitologia), BR 316, Km 07 – CEP 67.030-000 – Ananindeua-PA. Tel: 091-3214-2152 e 3214-2148

Coordenadora do Sub-Projeto Diarréias: Dras. Mônica Cristina M. Silva e Cyntia Oliveira - Instituto Evandro Chagas (Seção de Parasitologia – Laboratório de Amebíase e Lab. Bacteriologia). Tel: 091-3214-2148

Data: ___/___/___

1. Qual é o objetivo do estudo?

É conhecer melhor certos problemas de saúde dos habitantes de Juruti e assim contribuir com a Secretaria de Saúde para diagnosticar, tratar e evitar esses problemas.

2. Por que eu fui escolhido?

Porque você veio a uma unidade de saúde para se tratar ou porque você mora em uma área que os pesquisadores pretendem visitar.

3. Quais doenças vocês estão pesquisando?

Doenças que sem tratamento podem ser graves. São de três tipos:

1- Transmitidas por insetos que sugam o nosso sangue:

- Leishmaniose (ferida brava e calazar) - tatuquira
- Malária e Arboviroses (doenças que dão muita febre) - carapanãs
- Doença de Chagas (doença do coração) - barbeiros

2- Transmitidas pela água e alimentos contaminados

- Verminoses (pessoa fica mal nutrida e com dor de barriga)
- Diarréia (fezes aguadas)
- Hepatite A (doença no fígado)

3- Transmitidas pelo sexo ou sangue

- Doenças que geralmente dão desconforto, coceira e corrimento nas partes íntimas. Atingem tanto homens quanto mulheres.
- Hepatite B, C e D (doença no fígado)
- Papiloma (verrugas nas partes íntimas)
- AIDS (doença no corpo todo que deixa as pessoas muito fracas)

4. Sou obrigado a participar da pesquisa?

Não! Você é livre para decidir e para retirar seu consentimento a qualquer tempo, sem se justificar e sem que isso afete os cuidados dos pesquisadores com sua saúde ou seu relacionamento com eles.

5. Se eu aceitar, o que tenho que fazer?

Para a maioria pediremos que permita um ou no máximo dois exames de sangue. Em alguns casos pediremos que permita outros exames: 1- exame de fezes; 2- das partes íntimas; 3- de alguma ferida pele; 4- teste de pele parecido com vacinação.

6. Quais os riscos para quem participar?

O risco é a pessoa sentir um pouco de dor durante a coleta de sangue pela picada da agulha. Para quem tiver suspeita de ferida brava um risco é sentir desconforto ao se tirar um pedacinho da borda da ferida com anestesia ou ao se realizar um teste de pele semelhante à vacinação, que poderá causar vermelhidão local, mas sumirá em poucos dias. Para quem necessitar de exame das partes íntimas há risco da pessoa ficar com vergonha de mostrar ao médico, que necessitará retirar secreção para exame, caso tenha. Quem fizer exame de fezes terá apenas que colocar em um potinho, lavar as mãos e levar o potinho rapidamente ao hospital, O trabalho será feito por pessoas experientes, sendo o atendimento médico no Hospital.

7. Quais benefícios para quem participar?

Os exames servem para você saber qual doença você tem e assim fazer o tratamento correto. Na Secretaria de Saúde pretendemos implantar novos métodos de diagnóstico e modernizar o que já está sendo feito. O Sistema Único de Saúde (o SUS) ficará mais forte e atenderá melhor às necessidades da população de Juruti.

8. E se eu quiser fazer alguma reclamação?

Na improvável situação de você ou suas crianças se sentirem prejudicados poderão protestar. A Secretária de Saúde ou sua substituta (Dra. Márcia ou Sra. Ariadne) são as autoridades no município que podem dar informações sobre o projeto ou auxiliá-los a manifestar algum protesto na justiça, caso desejem.

9. Minha participação nesse estudo será confidencial?

Sim. Todas as informações sobre você ou seus familiares nesta pesquisa serão confidenciais e usadas apenas para análise dos resultados. Seu nome ou de seus familiares não serão revelados fora das instituições de pesquisa.

10. Quem está coordenando e pagando pela pesquisa?

O Instituto Evandro Chagas coordena e faz os exames de laboratório. A Secretaria de Saúde de Juruti faz o seu atendimento normal e tratamento das pessoas doentes. A ALCOA financia a maior parte. O governo Federal financia a outra parte.

11. Como obter mais informações?

No Hospital de Juruti. Pergunte na recepção como se dirigir a nós. Se desejar, pode falar com as Coordenadoras da Pesquisa, Dras. Lourdes Maria Garcez (0-XX-91-3214-2152), Marinete Póvoa (0-XX-91-3214-2148) ou Izabel Carvalho (0-XX-91-3214-2150).

12. Se eu concordar em participar ou que minhas crianças participem, o que devo fazer?

Neste caso lhe será pedido que assine este termo de consentimento. Você também será convidado a assinar um termo para cada menor sob a sua responsabilidade que você concorde que participe do estudo. Leia abaixo!

Nome: _____ Sexo () M () F. Idade _____
Endereço: _____

Para autorizar a SUA PARTICIPAÇÃO marque com um "X" se concordar com os termos

1. **PARTICIPAÇÃO DE ADULTO:** Confirmando que li, entendi as informações sobre o estudo no termo de consentimento livre e esclarecido e tive oportunidade de fazer perguntas, por isso concordo em participar da pesquisa.

2. PARTICIPAÇÃO DE CRIANÇA: Confirmando que li, entendi as informações sobre o estudo no **termo de consentimento livre e esclarecido** e tive oportunidade de fazer perguntas por isso concordo que o menor, cujo nome está descrito acima, participe da pesquisa.

Nome da pessoa que consente

Assinatura

Pesquisador

Assinatura

Nome da pessoa que obteve o consentimento (se diferente do pesquisador) Assinatura

Testemunhas (necessárias quando o indivíduo que deseja participar não puder assinar seu nome):

Nome da testemunha

Assinatura

Nome da testemunha

Assinatura



Anexo 2

Saúde no município de Juruti, Pará: cenário atual, desafios e possibilidades

Coordenadoras do Projeto: Dras. Lourdes Maria Garcez e Marinete Marins Póvoa - Instituto Evandro Chagas (Seção de Parasitologia), BR 316, Km 07 – CEP 67.030-000 – Ananindeua-PA. Fone: 091-3214-2152 e 3214-2148

Coordenadora do Sub-Projeto Diarréias: Dra. Mônica Cristina de Moraes Silva e Cyntia Oliveira - Instituto Evandro Chagas (Seção de Parasitologia – Laboratório de Amebíase e Lab. Bacteriologia). Fone: 091-3214-2148

FICHA EPIDEMIOLÓGICA

No da amostra: _____ Data: _____
 Nome: _____ Sexo: () F () M
 Idade: _____ Local de Nascimento: _____
 Endereço: _____ Tel.: _____
 Bairro: _____ Cidade: _____ UF: _____
 Quanto tempo mora neste endereço? _____

Como são seus hábitos alimentares e de higiene:

- Bebe água: () mineral () fervida () torneira () filtrada () rio () coada () poço
- Consome alimento cru? () Sim () Não. Quais? _____
- Lava os alimentos antes de comer? () Sim () Não
- Lava as mãos antes de consumir alimento? () Sim () Não
- Lava as mãos após o uso do banheiro? () Sim () Não
- Consome frequentemente alimentos: () rua () casa () restaurante
- Consome alimento de: () feira () supermercado () outros
- Ingere bebida alcoólica? () Sim () Não. Há quanto tempo? _____
- Já teve amebíase? () Sim () Não. Há quanto tempo? _____
- Quais os sintomas? _____

Inquérito Sanitário

- Abastecimento de água () Rede geral () Poço () outro
- Você faz algum tratamento de água no seu domicílio:
 () Filtração () Cloração () Fervura () Sem tratamento
- Esgotamento sanitário em uso:
 () Rede geral () Fossa séptica () outro () Não tem
- Destino do lixo () Coletado () Queimado/enterrado () Céu aberto () Outro
- Qual o tipo de construção de sua habitação (alvenaria, pau-a-pique, madeira, palafitas) _____
- Quantas pessoas moram no domicílio? _____

OBS: Verificar o tamanho das unhas e aspecto das mãos (Unhas grandes? Mãos sujas?)

Sintomas atuais:

Náuseas? () Sim () Não

Vômito? () Sim () Não

Diarréia? () Sim () Não. Com sangue? () Sim () Não. Quantos episódios ao dia? _____

Dores abdominais? () Sim () Não

Constipação intestinal? () Sim () Não

Febre? () Sim () Não

Dor no fígado? () Sim () Não

Icterícia? () Sim () Não

Hepatomegalia? () Sim () Não

Fez algum tipo de tratamento atualmente? () Sim () Não. Qual? _____