

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
CURSO DE BIOMEDICINA

THIAGO DOS SANTOS GOMES

Diagnóstico Diferencial do Complexo *E. histolytica*/ *E. dispar* por Multiplex-PCR e PCR Tempo Real em amostras de fezes.

Niterói
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
CURSO DE BIOMEDICINA

THIAGO DOS SANTOS GOMES

Diagnóstico Diferencial do Complexo *E. histolytica/ E. dispar* por Multiplex-PCR e PCR Tempo Real em amostras de fezes.

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade Federal Fluminense para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientadores: Prof^a Dr^a Regina Helena Saramago Peralta
Prof. Dr. José Mauro Peralta

Niterói
2008

THIAGO DOS SANTOS GOMES

Diagnóstico Diferencial do Complexo *E. histolytica*/ *E. dispar* por Multiplex-PCR e PCR Tempo Real em amostras de fezes.

Trabalho de Conclusão de Curso(TCC) apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade Federal Fluminense para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em Dezembro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Regina Helena Saramago Peralta
Universidade Federal Fluminense

Prof^a Dra. Margareth Maria Lessa Gonçalves
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Fernando Campos Sodré
Universidade Federal Fluminense

Niterói
2008

"Procure ser uma pessoa de valor,
em vez de procurar ser uma pessoa de
sucesso. O sucesso é consequência."

Albert Einstein

Dedico minha monografia aos meus pais, Benicio e Marlene, por fazerem o possível e o impossível para fornecerem os meios para que eu pudesse seguir o caminho que escolhi.

Aos meus tios Marly e Sidney, pela sua constante presença e participação, contribuindo para que eu fosse mais saudável e feliz.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por estar sempre presente dando forças e esperança para superar os obstáculos que a vida impõe.

Aos meus orientadores, Prof^a Dra. Regina Helena Saramago Peralta e Prof. Dr. José Mauro Peralta, por pacientemente compartilharem seu vasto conhecimento científico, enriquecendo a minha jornada de graduação, e também por confiarem na minha capacidade permitindo que eu fizesse parte de seus projetos.

Aos membros, ex-membros e colegas do laboratório 046, do Departamento de Imunologia do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ. O acolhimento de vossa parte, os ensinamentos compartilhados e a ajuda oferecida nos momentos que foram necessários fizeram de vocês (Luci Ana, Helena, Margareth, Carlos, Nathalia, Mauro, Ronald, Maristella, João, Bruna, Diva e Jorge) peças-chave na conclusão deste trabalho e também grandes amigos com os quais compartilhei momentos extremamente agradáveis que tornaram mais prazerosos os meus dias de trabalho.

Aos amigos da 5^a Turma de Biomedicina da UFF, que foram companheiros nas aulas, trabalhos, passeios, estudos e momentos de diversão ao longo dessa jornada que foi o Curso de Graduação em Biomedicina. Eu não poderia ter feito parte de nenhuma outra turma, pois as pessoas com as quais convivi nessa turma fizeram esses 4 anos de graduação ficarem marcados na minha memória como uma época em que eu fui extremamente feliz e que nunca esquecerei.

Aos amigos dos tempos do Colégio Palas, por serem compreensivos e entenderem tantos momentos que não pude estar presente em nossos encontros devido a provas, trabalhos e compromissos relacionados à vida universitária.

Aos professores do curso de Biomedicina da Universidade Federal Fluminense, por compartilharem cada um com um pouco do seu conhecimento, contribuindo para a minha formação intelectual ao longo desses 4 anos de graduação.

E principalmente aos meus pais e demais familiares, por estarem sempre nos bastidores dando o apoio necessário para que eu chegasse ao fim dessa jornada, podendo finalmente estar preparado para outras as outras jornadas que ainda virão.

Aos amigos que não fazem parte dos grupos citados acima, mas que não são menos especiais, pois também foram grandes companheiros nesse período.

RESUMO

O gênero *Entamoeba* tem grande importância médica entre os protozoários que parasitam o homem, compreendendo várias espécies que são morfologicamente indistinguíveis através da microscopia óptica. No entanto, a espécie considerada capaz de causar doença, *Entamoeba histolytica*, era anteriormente considerada uma única espécie que compreendia cepas patogênicas e cepas não-patogênicas. Recentemente, evidências suficientes foram encontradas reclassificando esse protozoário em duas espécies morfologicamente idênticas: a potencialmente patogênica *E. histolytica* e a não-patogênica *E. dispar*. Essa reclassificação trouxe a necessidade de se reavaliar a epidemiologia da amebíase, devido à alta frequência de *E. dispar*, sendo considerada como *E. histolytica*. Devido a isso, atualmente quando na microscopia óptica observa-se o cisto característico, o mesmo é considerado do complexo *E. histolytica/E. dispar*. Dependendo da forma evolutiva e das condições em que se encontre, a *E. histolytica* pode habitar determinados meios: o intestino seguindo seu ciclo biológico, o cisto permanecendo no solo ou água durante algum tempo após ser eliminado em fezes moldadas, ou nos tecidos ao desenvolver a doença invasiva. O diagnóstico laboratorial da amebíase na rotina dos laboratórios clínicos é baseado no exame parasitológico de fezes, no qual é realizada a pesquisa de formas evolutivas de *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii* e *E. hartmanni*. No entanto, essa técnica não é capaz de identificar entre essas espécies morfologicamente semelhantes de *E. histolytica*, dando ao método um caráter mais sugestivo do que diagnóstico. Por isso, cada vez mais ensaios moleculares, como o ELISA para detecção de antígeno ou anticorpo e como a PCR para detecção de DNA, são descritos na busca de fornecer métodos diagnósticos mais sensíveis, específicos e rápidos. Neste estudo foram avaliadas as técnicas de Multiplex-PCR e PCR Tempo Real no diagnóstico diferencial entre *E. histolytica* e *E. dispar* em amostras, provenientes de moradores do projeto de assentamento Frei Vantuy da cidade de São Jorge de Ilhéus na Bahia, diagnosticadas como positivas pelo exame parasitológico de fezes (EPF). Pela Multiplex-PCR, seis entre 24 amostras que eram consideradas positivas para o complexo *E. histolytica/E. dispar* pelo EPF, foram diagnosticadas como positivas para *E. dispar* e nenhuma para *E. histolytica*. Pela PCR Tempo Real, uma amostra foi positiva para *E. histolytica* e 13 amostras foram positivas para *E. dispar*. A técnica de Multiplex-PCR apresenta uma boa sensibilidade e especificidade, no entanto, o PCR Tempo Real detectou DNA em um número maior de amostras. Uma hipótese levantada para este resultado seria o baixo rendimento do processo de extração de DNA, com concentrações de DNA abaixo inclusive do limite de detecção do Multiplex-PCR, mas possível pela PCR Tempo Real por ser um método muito mais sensível. Quanto aos resultados negativos, eles podem indicar resultados falso-positivos pela microscopia ou, também, a presença de infecções por outras espécies de amebas morfologicamente semelhantes, por isso não sendo identificadas pelo método utilizado no estudo, visto que foram utilizados apenas iniciadores específicos para a amplificação de seqüências das espécies *E. histolytica* e *E. dispar*.

Palavras-chave: *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, PCR

ABSTRACT

The genus *Entamoeba* has importance among the protozoans capable of causing infection in humans, comprising many species that are morphologically indistinguishable by microscopy. However, the species known as capable of causing disease is *Entamoeba histolytica* which was considered for a long time as only one species with two strains, one pathogenic and another non-pathogenic. Recently, enough evidences were found showing the need of rename this protozoan into two species morphologically identical: the potentially pathogenic *E. histolytica* and the non-pathogenic *E. dispar*. This reclassification brought the need of evaluate the epidemiology of amoebiasis, because of the high prevalence of *E. dispar*, a species that were considered as *E. histolytica* previously. Nowadays, when the cyst is found by microscopy, the parasite is classified as belong to *E. histolytica*/*E. dispar* complex, because it is impossible to differentiate the species only by this method. In the biological cycle, *E. histolytica* can habitat different environments: intestine, water and soil, where it maintain alive during some time after its elimination within the feces, or in the human tissues where it develop the invasive disease. Laboratorial diagnosis of amoebiasis in clinical labs is based in the microscopy, searching for *Entamoeba histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii* and *E. hartmanni* morphological characteristics. However, this method did not allow differentiating this species of the parasite, thus its results are more a suggestion than a diagnosis. As a consequence of this lack of specificity and the low sensitivity of microscopy examination, new assays as ELISA for antigen or antibody detection and PCR for detection of DNA are described, showing an effort in providing more sensitive, more specific and faster diagnostic methods. In this study we evaluated a multiplex-PCR and the real time PCR in samples from residents of Frei Vantuy in São Jorge de Ilhéus (Bahia, Brazil) considered positive to the complex by microscopy in order to differentiate *E. histolytica* from *E. dispar*. Among the 24 stool samples diagnosed as positive to the *E. histolytica*/*E. dispar* complex, six of these samples were diagnosed as positive to *E. dispar* by the Multiplex-PCR, but none of the samples were positive for *E. histolytica*. However, one stool sample was diagnosed as positive to *E. histolytica* and others 13 samples were diagnosed as positive to *E. dispar* by real time PCR. The Multiplex-PCR is a sensitive and specific method, but the higher detection by the real time PCR leaded to suspect of a low income of the DNA extraction method, resulting in such a low concentration of DNA that the Multiplex-PCR could not detect, but the Real Time PCR could do it because of its higher sensitivity. And negative results can indicate the presence of infection by other amoeba species morphologically identical to the *E. histolytica* and *E. dispar*.

Keywords: *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, PCR

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Cisto do complexo <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	5
Figura 2: Trofozoíta de <i>Entamoeba histolytica</i>	6
Figura 3: Ciclo Biológico da <i>Entamoeba histolytica</i>	7
Figura 4: Modelo esquemático do processo de invasão da mucosa.....	9
Figura 5: Invasão da mucosa por trofozoítas	10
Figura 6: Extenso abscesso amebiano, ocupando quase inteiramente o lobo direito do fígado.....	12
Figura 7: Esquema simplificado da reação de Multiplex-PCR.....	19
Figura 8: Esquema do procedimento de PCR Tempo Real.....	20
Figura 9: Sonda de Taq Man sendo retirada da seqüência específica conforme a Taq polimerase amplifica o gene codificado pelo <i>primer</i>	21
Figura 10: SYBR Green I se intercalando entre as duas fitas de DNA.....	21
Tabela 1: Resultado do Exame Parasitológico de Fezes	30
Figura 11: Fotografia de gel de agarose a 2%.....	31
Figura 12: Fotografia de gel de agarose a 2%.....	32
Figura 13: Fotografia de gel de agarose a 2%.....	32
Figura 14: Gráfico das temperaturas de dissociação média da reação de PCR Tempo Real.....	33
Figura 15: Gráfico da amplificação das amostras pela reação de PCR Tempo Real para a detecção de <i>E. histolytica</i>	34
Figura 16: Gráfico da amplificação das amostras pela reação de PCR Tempo Real para a detecção de <i>E. dispar</i>	35
Tabela 2: Resultados das técnicas de Multiplex-PCR, PCR Tempo Real SYBR Green I e PCR Tempo Real Taq Man.....	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 HISTÓRICO	1
1.2 O PARASITO	4
1.3 CICLO BIOLÓGICO	6
1.4 PATOGENIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	8
1.4.1 Patogenia	8
1.4.2 Manifestações Clínicas	10
1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	13
1.5.1 Exame Parasitológico de Fezes	13
1.5.2 Análise do Padrão Eletroforético de Isoenzimas	13
1.5.3 Detecção de Antígeno	14
1.5.4 Detecção de Anticorpos Específicos	16
1.5.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	17
1.5.6 Reação em Cadeira da Polimerase em Tempo Real	19
2 OBJETIVOS	23
2.1 GERAL	23
2.2 ESPECÍFICO	23
3 METODOLOGIA	24
3.1 AMOSTRAGEM	24
3.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR.....	25
3.2.1 Extração de DNA	25
3.2.2 Amplificação do DNA	26
3.2.3 Visualização da Amplificação	27
4 RESULTADOS	29
4.1 MULTIPLEX-PCR	31
4.2 PCR TEMPO REAL	32
5 DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÕES	42
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

A amebíase é uma infecção que pode evoluir para doença invasiva intestinal ou extra-intestinal que é causada por uma espécie de protozoário denominada *Entamoeba histolytica*. Aproximadamente 10% da população mundial é reconhecida como estando infectada pelo parasita, resultando em cerca de 100.000 mortes ao redor do mundo anualmente, constituindo também a segunda maior causa de mortes devido a protozoários (WHO, 1997). No entanto, os dados relacionados à infecção por *E. histolytica* podem ter um valor superestimado para a prevalência do protozoário devido a esses dados epidemiológicos datarem de antes da separação entre a potencialmente patogênica *E. histolytica* e a não-patogênica *E. dispar* (Ali *et al.*, 2008). Essa doença é comumente observada em regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo os humanos seus hospedeiros primários.

1.1 HISTÓRICO

Em 1875, Fedor Lösch descreveu a presença de trofozoítas móveis em fezes de um trabalhador de São Petesburgo que sofria de disenteria, denominando-os como “*Amoeba coli*”. No entanto, ele nunca atribuiu um significado etiológico para a presença da ameba, acreditando que a disenteria fosse causada por bactérias e a presença da ameba somente aumentasse a reação inflamatória. Durante os anos seguintes, muitos autores confirmaram a observação de Lösch sobre as concomitantes infecções

bacterianas e amebianas em pacientes com disenteria. Contudo, Councilman & Lafleur observaram em 1891 a presença de “*Amoeba coli*” em pus de abcesso hepático livre de bactérias, demonstrando um potencial patogênico da espécie sem a presença concomitante de bactérias. Eles, então, a renomearam como “*Amoeba dysenteriae*” (*apud* Jackson, 1998).

Em 1903, foi estabelecido o nome do gênero como *Entamoeba* e Schaudinn reconheceu a presença de duas espécies: uma patogênica, a qual ele denominou *Entamoeba histolytica*, e uma outra não-patogênica, denominada *Entamoeba coli*. Em 1913, Walker & Sellards desenvolveram um estudo experimental no qual infectavam indivíduos com *E. histolytica*, *E. coli* e amebas de vida livre, através da ingestão oral de cistos e trofozoítas, observando ao final desse estudo prospectivo que apenas *E. histolytica* era capaz de desenvolver disenteria entre os indivíduos que se tornaram parasitados, confirmando a hipótese de Schaudinn (*apud* Jackson, 1998).

Após esses estudos indicando que *E. histolytica* era a espécie causadora da doença, foi observada a baixa frequência do desenvolvimento da doença em indivíduos infectados com *E. histolytica* e logo essa observação gerou inúmeras controvérsias e hipóteses. Em 1919, Dobell considerou que *E. histolytica* era um parasito tecidual obrigatório que somente causava doença quando o equilíbrio entre o mesmo e o hospedeiro era rompido, enquanto Kuenen & Swellengrebel haviam previamente considerado o parasito como uma espécie comensal, responsável apenas pela propagação da espécie, mas que certos estímulos podiam causar uma mutação que transformava o parasito numa forma invasora de tecidos, perdendo a capacidade de produzir cistos, o que significava efetivamente cometer um suicídio, por perder a capacidade de transmissão para outros hospedeiros (*apud* Cáceres & Miranda, 2004).

Em 1925, Emile Brumpt propôs que a existência de tantos casos assintomáticos tinha como explicação a existência de duas espécies: uma não-patogênica, a qual ele denominou *Entamoeba dispar*, e outra patogênica, denominada *E. dysenteriae*. Estas duas espécies teriam ciclos biológicos separados que, no entanto, resultavam em cistos morfologicamente idênticos. Brumpt ainda acrescentava a possibilidade de existir portadores assintomáticos de *E. dysenteriae*. Porém, esse conceito não foi amplamente

aceito durante os 50 anos seguintes (Stauffer & Ravdin, 2003; Cáceres & Miranda, 2004).

Em 1978, Sargeant se dedicou a analisar o padrão eletroforético das isoenzimas de hexoquinase, percebendo a existência de dois padrões eletroforéticos, um correspondente a uma cepa patogênica e outro a cepa não-patogênica. Em conjunto com grupos de pesquisadores dos Estados Unidos, México, Europa, Israel, Índia, Japão e África do Sul, o grupo de Sargeant estudou a distribuição mundial dos padrões eletroforéticos em cerca de 10.000 casos de amebíase. Ao fim desse estudo, os resultados mostraram que todos os pacientes com amebíase invasiva estavam infectados com amebas que apresentavam os mesmos zimodemas enquanto os pacientes com infecção assintomática estavam infectados com amebas que apresentavam zimodemas idênticos e zimodemas distintos do anterior (Jackson, 1998). Em 1982, Sargeant *et al.* sugeriram que existiam duas espécies e que a proposta de Emile Brumpt deveria ser aceita.

Ao comparar os achados acerca dos zimodemas patogênicos e não-patogênicos com os achados clínicos, epidemiológicos e sorológicos, foi observado que entre os pacientes com amebíase assintomática 1% apresentavam infecção por *E. histolytica* enquanto 9% estavam infectados por *E. dispar* e que os pacientes com amebíase sintomática ou invasiva apresentavam resposta sorológica se associando aos zimodemas patogênicos, mas não aos não-patogênicos (Chacín-Bonilla, 2001).

Em 1989, Egbert Tannich *et al.* provaram através de um estudo definitivo que havia diferenças entre as ditas formas patogênicas e não patogênicas de *E. histolytica* através da análise de ácidos nucleicos (DNA – *deoxyribose nucleic acid*). Em 1991, Clark & Diamond confirmaram as observações de Tannich e ainda afirmaram que a distância genética entre as duas formas era tão extensa quanto à distância entre homens e camundongos. Em 1993, Clark & Diamond afirmaram a existência de duas espécies e propuseram que fossem nomeadas como *E. histolytica* e *E. dispar* (Diamond & Clark, 1993).

A partir de 1993, dados bioquímicos, genéticos, sorológicos, clínicos e epidemiológicos começaram a se acumular, confirmando a diferença entre as duas espécies, então, em 1997, a Organização Mundial de Saúde e os pesquisadores

presentes no Seminário de Amebíase no México anuíram que *E. histolytica* e *E. dispar* eram duas espécies morfológicamente idênticas por microscopia óptica, constituindo o complexo *E. histolytica/E. dispar*. O protozoário *E. histolytica* ficou sendo considerado patogênico e invasivo e a *E. dispar* como uma ameba comensal que se limita ao lúmen do intestino. Dessa forma, tornou-se necessária a padronização de técnicas que fossem capazes de diferenciar as duas espécies (WHO, 1997).

1.2 O PARASITO

O gênero *Entamoeba* é um dos gêneros de importância médica de protozoários que parasitam o homem. As amebas pertencentes a este gênero caracterizam-se pelo núcleo esférico, de aspecto vesiculoso, com cromatina periférica enquanto um ou mais grânulos cromáticos se reúnem no centro, formando o cariossomo. As espécies de *Entamoeba* podem ser distribuídas em determinados grupos de acordo com o número de núcleos que apresentam na sua forma cística: cistos com até oito núcleos, cistos com até quatro núcleos, cistos com núcleo único e cistos sem núcleo conhecido (Rey, 2001).

Várias amebas deste gênero podem ser encontradas parasitando o trato intestinal humano, como *E. coli*, *E. hartmanni*, *E. dispar* e *E. histolytica*, além de *E. polecki*, uma ameba parasito do porco que já foi descrita em um pequeno número de fezes humanas. Há ainda relatos de infecções humanas pela *E. chattoni*, que é normalmente associada a primatas não-humanos e *E. moshkovskii*, que é considerada primariamente uma ameba de vida livre (Ali *et al.*, 2008). As espécies *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. hartmanni*, *E. moshkovskii* e *E. polecki* são morfológicamente semelhantes na microscopia óptica. No entanto, a *E. hartmanni* pode ser diferenciada da *E. histolytica* pelo seu tamanho.

A identificação dessas espécies pode também ser feita por meio da análise do perfil de isoenzimas, pelo polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição, pela detecção de antígenos nas fezes através de anticorpos monoclonais e através das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR – Polimerase Chain Reaction). Adicionalmente, por meio de estudos sorológicos, foi visto que a única espécie cuja infecção pode levar ao aparecimento de anticorpos específicos no plasma é *E. histolytica*, sendo então esta a única capaz de invadir os tecidos do hospedeiro,

causando doença extraintestinal em determinadas condições. As outras espécies são consideradas não-invasivas e comensais.

A classificação taxonômica da *E. histolytica* é Reino Protista, Filo Sarcomastigofora, Subfilo Sarcodina, Superclasse Rhizopoda, Classe Lobosea, Subclasse Gymnamoebia, Ordem Amoebida, Subordem Tubulina e Família Endamoebidae (Levine *et al.*, 1980).

A epidemiologia acerca da *E. histolytica* está sendo reavaliada, já que os dados previamente existentes englobavam também infecções por *E. dispar*, equivocadamente diagnosticadas como infecções assintomáticas por *E. histolytica* (Tanyuksel e Petri, 2003). No entanto, deve-se lembrar que há também portadores assintomáticos de *E. histolytica* e que estes devem ser tratados, pois podem desenvolver a doença futuramente, além de serem disseminadores do parasito (Jackson, 1998). Embora uma minoria das infecções por *E. histolytica* progridam para doenças intestinais, como diarreia ou disenteria, ou extra-intestinais, como o abscesso hepático amebiano, as bases para essa diferença nas manifestações clínicas ainda permanecem sem serem resolvidas. Estudos recentes sugerem que o genótipo do parasita pode ter um papel determinante na manifestação clínica da infecção por *E. histolytica* (Ali *et al.*, 2008).



Figura 1: Cisto do complexo *E. histolytica*/*E. dispar* (Imagem capturada no Laboratório de Parasitologia do Hospital Universitário Antônio Pedro – UFF)



Figura 2: Trofozoíta de *Entamoeba histolytica*
(Fonte: American Academy of Pediatrics)

1.3 CICLO BIOLÓGICO

Os indivíduos são contaminados através da ingestão de cistos presentes em água e alimentos contaminados por fezes de pessoas portadoras de *E. histolytica*. Estas formas se desencistam no intestino delgado, formando, cada cisto tetranucleado, oito amebas na fase metacística, que se alimentam e crescem na luz do intestino até evoluírem para a fase trofozoítica. Os trofozoítas, por sua vez, são maiores e mais ativos, se alimentando e podendo multiplicar-se indefinidamente na luz do intestino grosso. Em determinado momento, os trofozoítas passam a se modificar para constituir a forma pré-cística, reduzindo sua atividade, deixando de se alimentar e diminuindo de tamanho; em torno delas é formado, então, um envoltório resistente que é a parede cística, ocorrendo também alterações no citoplasma e duas divisões do núcleo. Os trofozoítas podem também invadir e causar danos à mucosa do intestino, chegando à circulação, onde podem causar lesões em outros órgãos, levando a um quadro de amebíase extraintestinal (Rey, 2001).

Dependendo das condições e da fase que se encontre, a *E. histolytica* pode habitar alguns determinados ambientes: o intestino, seguindo seu ciclo biológico; o cisto

permanecendo no solo ou água durante algum tempo após ser eliminado em fezes moldadas; ou os tecidos ao desenvolver a doença invasiva. Os tecidos invadidos no ciclo patogênico geralmente são a mucosa e submucosa do intestino grosso; e, mais raramente, o intestino delgado, a pele, o fígado, os pulmões, a pleura, o cérebro, etc. Esses ciclos (o patogênico e o não-patogênico) podem ocorrer simultaneamente ou não.

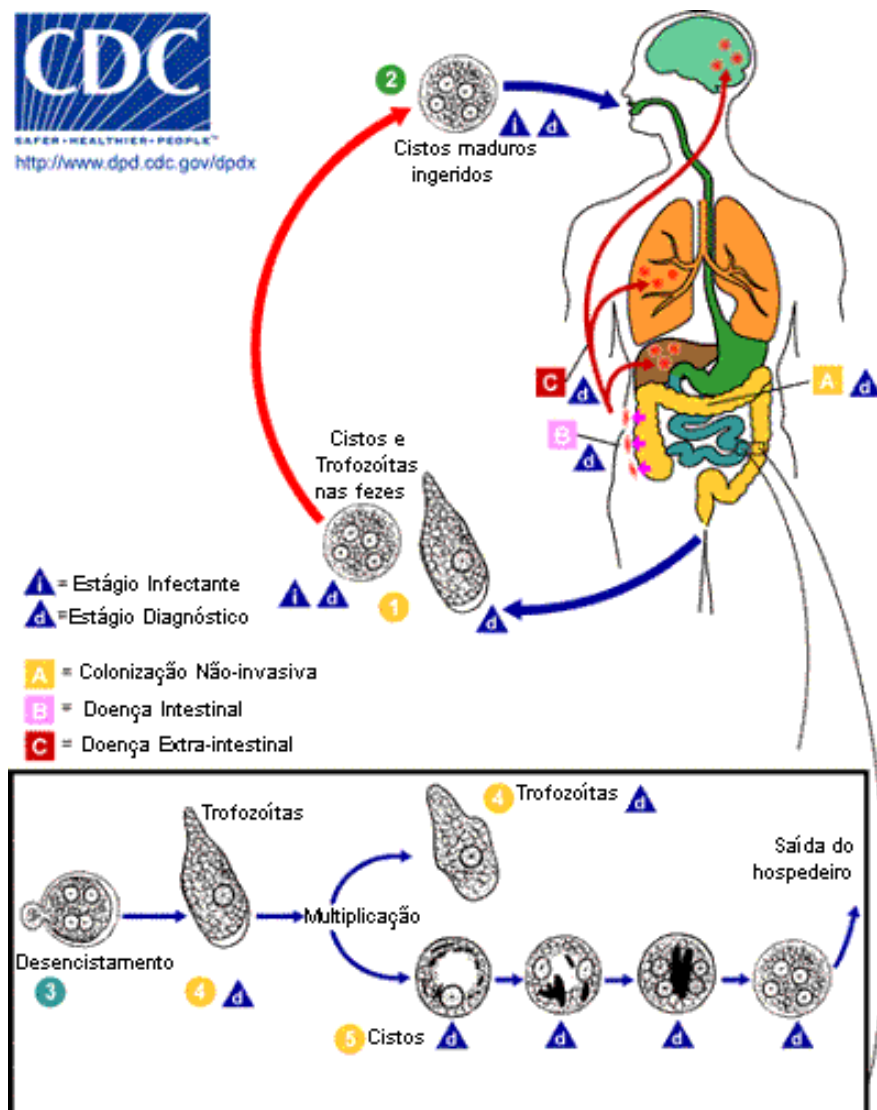


Figura 3: Ciclo Biológico da *Entamoeba histolytica* (Adaptada de figura do CDC - Centers for Disease Control and Prevention)

1.4 PATOGENIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

1.4.1 Patogenia

Os mecanismos de patogenia da *E. histolytica* auxiliam na invasão ao tecido do hospedeiro, que é um processo complexo e constituído de vários estágios.

A destruição da célula do hospedeiro para permitir a invasão começa com o contato e ligação do trofozoíta, um processo mediado pela Gal/GalNAc lectina, que é capaz de se aderir especificamente a resíduos de galactose e N-acetil-D-galactosamina das células do hospedeiro (Tanyuksel & Petri, 2003). Apesar dessa adesina ser intensivamente estudada, há outras moléculas envolvidas nesse processo: uma proteína de membrana de 220 KDa, uma proteína rica em serina e um dímero de cisteína proteinase-adesina. Essa ligação do trofozoíta à célula hospedeira é rapidamente seguida pela morte da célula do hospedeiro, processo no qual já foram identificados dois mecanismos: permeabilização através de peptídeos formadores de poros (amebaporo) e a indução de apoptose. As células apoptóticas são geralmente fagocitadas pelo trofozoíta de *E. histolytica*. Outros fatores que auxiliam na invasão são as cisteína proteinases secretadas, que desorganizam a matriz intracelular possibilitando a invasão e facilitando a difusão lateral do parasito dentro da mucosa. No final do processo de invasão, as células do hospedeiro têm um papel importante para permitir esse processo, pois elas secretam citocinas, como, por exemplo, a interleucina-8 (IL-8), que atraem neutrófilos e macrófagos. As evidências através de modelos experimentais indicam que essa resposta inflamatória tem um papel importante nesse processo de invasão da mucosa, incluindo a liberação de mediadores inflamatórios quando o neutrófilo é lisado pela *E. histolytica*. Na corrente sangüínea, o trofozoíta interage com o sistema complemento e várias moléculas da superfície do parasito são responsáveis por resistir a esse ataque, como os complexos lipofosfopeptideoglicos, a peroxiredoxina, inúmeras proteases e a Gal/GalNAc lectina (Ackers & Mirelman, 2006).

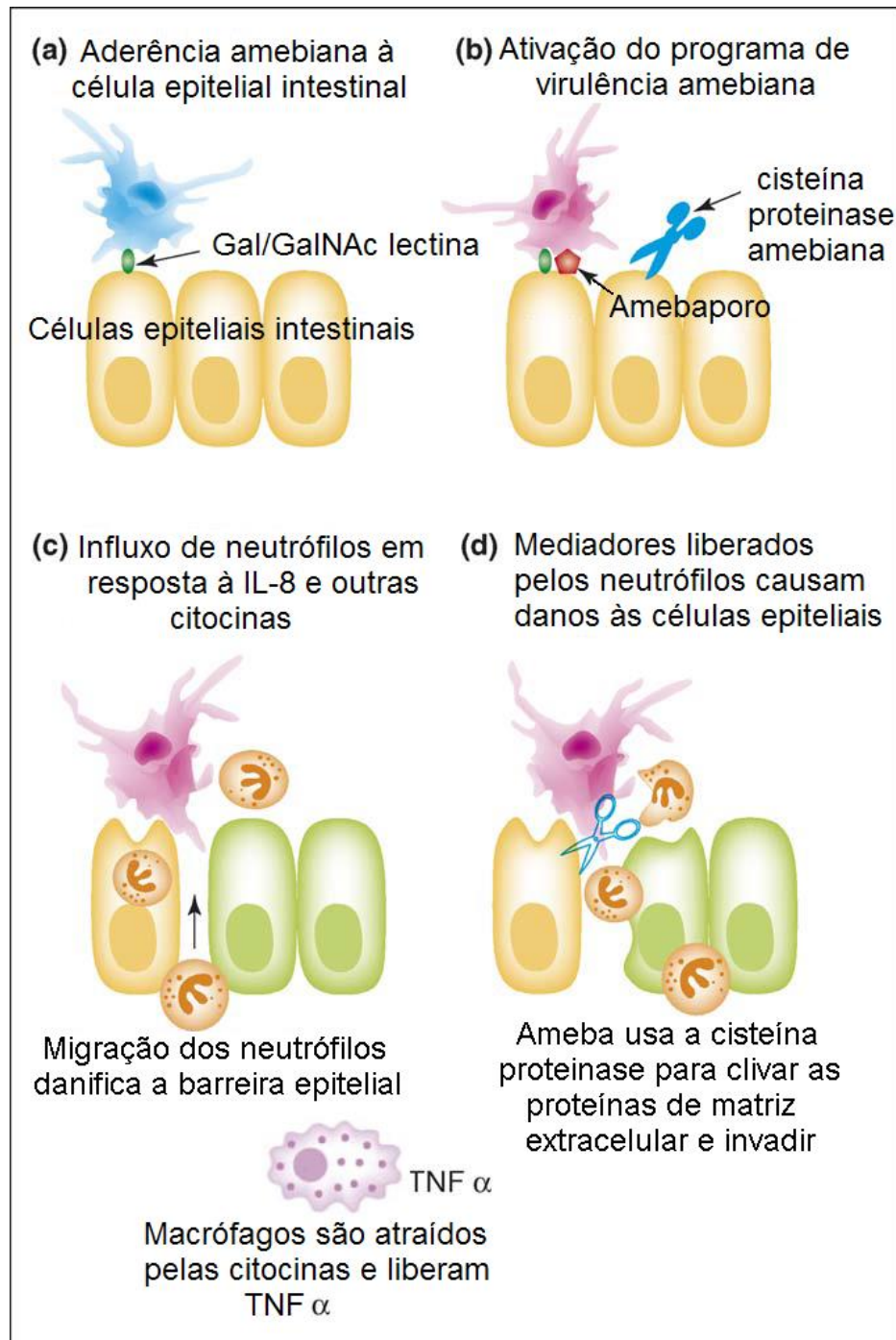


Figura 4: Modelo esquemático do processo de invasão da mucosa (Adaptada de artigo de Ackers & Mirelman, 2006)

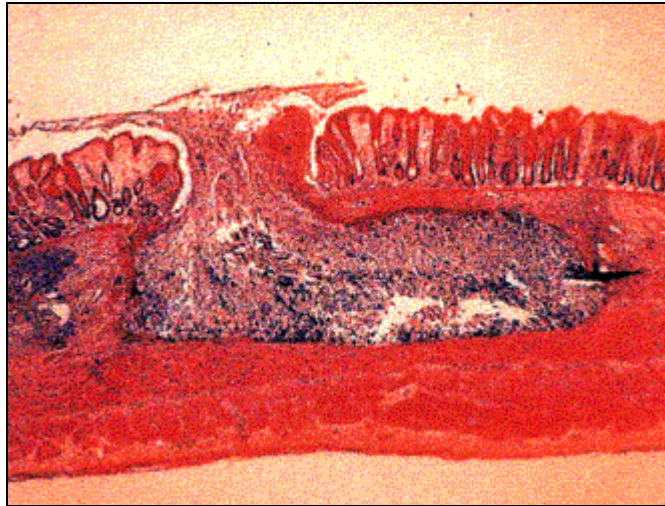


Figura 5: Invasão da mucosa por trofozoítas. A lesão se propaga lateralmente, formando uma úlcera amebiana (Salles *et al.*, 2003).

1.4.2 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas podem ser variadas, com a ocorrência de lesões no intestino, no fígado, na pleura, nos pulmões, na pele, entre outras localizações menos comuns.

A amebíase intestinal pode ser assintomática, sem apresentação de sinais clínicos, ou resultar mais tardiamente em colite amebiana ou complicações mais graves. No entanto, a chance da infecção assintomática evoluir para uma doença invasiva é de aproximadamente 10%. A manifestação clínica mais comum e súbita na amebíase intestinal geralmente é a disenteria amebiana, a qual se caracteriza por dor abdominal, febre (em menos de 40% dos casos), leucocitose discreta e evacuações freqüentes. As evacuações, em princípio, caracterizam uma diarréia aquosa, mas rapidamente evoluem para disenteria, com eliminação de muco e sangue. Os sintomas mais graves podem se atenuar entre 4 a 5 dias e a doença passar para uma fase crônica ou subaguda. Se o doente não for tratado, o quadro pode permanecer por várias semanas, causando anorexia e fraqueza, assim como nervosismo (Rey, 2001).

Outra manifestação clínica da amebíase é a colite amebiana crônica, na qual há ocorrência de crises diarréicas que duram poucos dias e são intercaladas por períodos

longos sem sintomas. A doença crônica pode gerar diversos incômodos no doente, tais como: fadiga, perda de peso, reduzida capacidade para o trabalho, perturbações funcionais gastrointestinais, insônia, inquietação, nervosismo e palpitação. Os sinais clínicos se evidenciam pelo cólon ligeiramente doloroso, mucosa friável e recoberta de muco com múltiplas ulcerações superficiais.

Na amebíase intestinal, a evolução para a forma fulminante, que é um dos quadros graves de grande destaque, atinge principalmente mulheres grávidas, pacientes imunocomprometidos e pacientes tomando corticosteróides. Essa forma se caracteriza por uma profusa diarreia mucossanguinolenta, febre, uma pronunciada leucocitose, dor em todo o abdômen, ulcerações na mucosa do cólon, podendo ainda ocorrer íleo paralítico, perfuração da parede intestinal e, por conseqüência, uma peritonite. A formação de amebomas pode também causar sintomas obstrutivos, passíveis de serem confundidos com carcinomas. A mortalidade é superior a 40% nesta forma grave da amebíase (Stanley *et al.*, 2003).

A amebíase hepática é uma das manifestações extraintestinais mais comuns da doença, sendo encontradas lesões no fígado em um terço dos casos de morte por amebíase. Os abscessos hepáticos amebianos surgem devido à difusão hematogênica dos trofozoítas, acredita-se que pela circulação porta. Os primeiros sinais podem ocorrer meses depois do indivíduo passar por uma área endêmica, muitas vezes nunca tendo apresentado uma história clínica de disenteria amebiana. A incidência do abscesso hepático é maior em adultos que em crianças. Os sintomas desse envolvimento do fígado podem surgir com febre, calafrios, náuseas, suores, fraqueza, vômitos, perda de peso e dor no hipocôndrio direito. Os achados laboratoriais mais comuns são leucocitose sem eosinofilia, anemia moderada, níveis aumentados de fosfatase alcalina e elevada taxa de sedimentação de hemácias (Rey, 2001). O diagnóstico é feito mediante a apresentação dos sintomas, concomitante com a evidenciação das lesões através de técnicas de imagem e evidenciação por diagnóstico laboratorial.

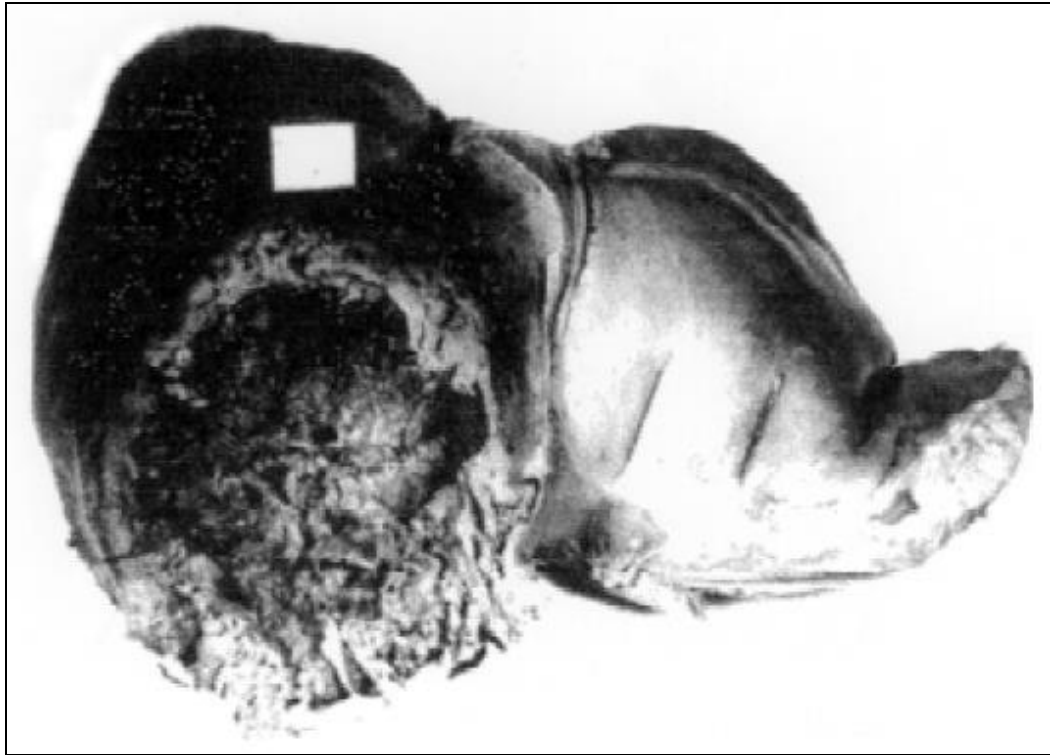


Figura 6: Extenso abscesso amebiano, ocupando quase inteiramente o lobo direito do fígado (Salles *et al.*, 2003).

Outras localizações extraintestinais podem ocorrer, principalmente de forma secundária ao abscesso hepático amebiano. A amebíase pleuropulmonar, por exemplo, se dá a partir da ruptura do diafragma adjacente ao abscesso hepático, causando empiema e efeitos no parênquima do pulmão direito que se encontra mais próximo do fígado; se houver a formação de uma fístula hepato bronquial, o paciente pode apresentar expectoração de um material escuro e necrótico, podendo conter inclusive trofozoítas. O abscesso hepático pode também resultar em outras complicações graves a partir de rupturas. A ruptura do peritônio pode causar peritonite e choque. A ruptura do pericárdio é ainda mais grave, gerando sinais similares à de uma pericardite, com uma elevada taxa de mortalidade. Há também ocorrências mais raras como as lesões cerebrais, que podem ser confundidas com abscessos piogênicos ou serem completamente inespecíficas, tornando o diagnóstico bastante difícil a não ser que haja antecedentes amebianos em outros órgãos. É considerada por alguns a fase terminal

das formas graves de amebíase. Existem também relatos de casos de lesões cutâneas, doenças genitais ou no trato urinário (Stanley *et al.*, 2003).

1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

1.5.1 Exame Parasitológico de Fezes (EPF)

O diagnóstico laboratorial da amebíase atualmente pode ser feito por várias técnicas, envolvendo microscopia óptica, métodos imunológicos para detecção de antígenos e anticorpos, e métodos moleculares. Durante muito tempo, o diagnóstico da infecção por *E. histolytica* foi baseado no exame parasitológico de fezes por métodos de concentração, no qual é realizada a pesquisa de formas evolutivas de *E. histolytica* no sedimento através da microscopia óptica. No entanto, a sensibilidade da técnica é de até 60% e pode também gerar resultados falso-positivos devido à identificação equivocada de macrófagos e de outras espécies de *Entamoeba* como sendo *E. histolytica* (Ali *et al.*, 2008). Como a técnica não permite a identificação da espécie do parasito, acaba tendo um caráter mais sugestivo do que diagnóstico, relatando apenas a presença de cisto do complexo *E. histolytica/E. dispar*. Somente a visualização de trofozoítas contendo hemácias fagocitadas é considerada uma característica capaz de diferenciar a *E. histolytica* de *E. dispar* e outras amebas de morfologia semelhante. Contudo, esse é um achado raramente visto (Van Hal *et al.*, 2007). Além da baixa especificidade pelos motivos citados, outro problema da técnica é a baixa sensibilidade devido à intermitência da eliminação de trofozoítas e de cistos nas fezes e da necessidade de ser realizada por profissionais bem treinados para a detecção e identificação do parasito.

A visualização do parasito no material clínico através do exame parasitológico de fezes pode ainda ser o método mais utilizado para o diagnóstico, mas os problemas de sensibilidade e especificidade levaram os pesquisadores a buscar outros métodos.

1.5.2 Análise do Padrão eletroforético de Isoenzimas

Um trabalho pioneiro feito por Sargeant *et al.* em 1978 demonstrou uma nova técnica como alternativa para o diagnóstico da amebíase, que é a caracterização de padrões isoenzimáticos, um método bioquímico que serve para diferenciar a *E. histolytica* da *E. dispar*. Este método é considerado “padrão ouro”, cujo princípio reside na mobilidade eletroforética de algumas enzimas da via glicolítica (hexoquinase, fosfoglicomutase, malato e glicose fosfoisomerase) de trofozoítas de cultura. O comportamento eletroforético da isoenzima hexoquinase é considerado também marcador de patogenicidade (Blanc & Sargeant, 1991; Ackers, 2002).

A eletroforese dessas isoenzimas no estudo de Sargeant permitiu que fossem identificados mais de 20 zimodemas, que são padrões eletroforéticos de mobilidade que aquelas enzimas tinham e que eram comuns a algumas cepas de amebas em cultura. Foi descrito no estudo o total de 24 zimodemas, 21 destes zimodemas descritos a partir de isolados humanos, sendo 9 pertencentes à *E. histolytica* e 12 à *E. dispar* (Tanyuksel & Petri, 2003; Fotedar *et al.*, 2007). Contudo, foi percebido após novos estudos, o desaparecimento de alguns zimodemas ao ser feita a remoção da flora bacteriana de algumas culturas, fazendo que ao fim desses estudos só permanecessem 4 zimodemas confiáveis (3 de *E. histolytica* e um de *E. dispar*), obtidos a partir de culturas axênicas (sem flora bacteriana). Dessa forma, os zimodemas restantes parecem estar relacionados a enzimas bacterianas (Ali *et al.*, 2008).

A análise de isoenzimas a partir de amebas de cultura apesar de ser considerada a técnica padrão-ouro no diagnóstico da infecção por *E. histolytica*, apresenta certas restrições. Há necessidade de uma cultura prévia por um período de 7 a 14 dias, que não positiva em aproximadamente 30% das amostras de fezes com cistos (Ackers, 2002) e há o risco de uma espécie crescer mais do que outra numa infecção mista gerando erro na identificação. Além disso, a técnica acaba se tornando trabalhosa devido a dificuldade de estabelecer e manter uma cultura com esses protozoários para a posterior análise eletroforética, o que exige um grande esforço e investimento do laboratório clínico, tornando o método inviável para a rotina laboratorial (Ali *et al.*, 2008).

1.5.3 Detecção de Antígeno

Muitas pesquisas e testes diagnósticos já existem com a proposta de detectar antígenos através de métodos imunológicos em materiais biológicos, como fezes, soro, fluido de abcesso e saliva (Tanyuksel & Petri, 2003). A detecção de antígenos em fezes, por exemplo, é tão sensível e específico quanto a cultura e a análise de isoenzimas (Delialioğlu *et al.*, 2008). Alguns ensaios usam anticorpos policlonais capazes de se ligarem a antígenos comuns à *E. histolytica* e *E. dispar*, logo sendo incapazes de identificar a espécie encontrada. A utilização nesses ensaios de anticorpos monoclonais permitiu a detecção de estruturas específicas de *E. histolytica* devido a pequenas diferenças que foram encontradas entre moléculas dessas duas espécies, como ocorre com a lectina, que é geralmente um dos antígenos mais pesquisados. Esta lectina (Gal/GalNAc lectina) é uma glicoproteína dimérica de 260 kDa capaz de aderir especificamente a resíduos de galactose e N-acetil-D-galactosamina das células do hospedeiro. A Gal/GalNAc lectina está presente na superfície do parasito e é mediadora da fixação do trofozoíta de *E. histolytica* à mucina do cólon e às células-alvo. No entanto, outros antígenos têm sido utilizados também nesses métodos, como um composto rico em serina, lectinas da superfície do parasito, um lipofosfoglicano, uma lectina aderente de 170 kDa detectada na saliva e mais um outro antígeno ainda não caracterizado (Fotedar *et al.*, 2007).

Esses ensaios podem ser feitos através de fitas imunocromatográficas ou de ELISA e apresentam várias vantagens se comparados com outros métodos usados para o diagnóstico de amebíase: eles têm uma excelente sensibilidade e especificidade; a disponibilidade de testes capazes de detectar o complexo *E. histolytica*/*E. dispar* e de testes específicos para *E. histolytica* permite a diferenciação entre as duas espécies; o formato da placa contendo 96 poços permite que o método seja feito em larga escala, auxiliando na rotina de um laboratório clínico e em estudos epidemiológicos; e sua rapidez e facilidade permitem que o método seja realizado nos laboratórios até por profissionais inexperientes nesta técnica (Tanyuksel & Petri, 2003). No entanto, a pesquisa de antígenos ainda apresenta algumas desvantagens significativas. Todos os testes atuais apresentam limitações com o fato de que os antígenos que são detectados podem sofrer desnaturação se passarem por um processo de fixação e conservação das amostras de fezes, sendo necessário o uso de amostras frescas ou congeladas e ainda

assim podendo fornecer resultados falso-negativos. Apesar de existirem testes específicos para *E. histolytica*, há relatos na literatura de reação cruzada entre *E. histolytica* e *E. dispar* em alguns testes, que confirmam por PCR a presença de *E. dispar* na amostra. Além disso, já existem métodos moleculares sensíveis e específicos mais adequados para o diagnóstico acurado da infecção e para estudos epidemiológicos mais detalhados (Furrows *et al.*, 2004).

1.5.4 Detecção de Anticorpos Específicos

Testes sorológicos para a identificação da infecção por *Entamoeba histolytica* podem ser ferramentas de auxílio numa perspectiva diagnóstica em países onde a infecção pelo parasito não é endêmica. Baseando-se no conceito de que a *E. histolytica* consegue causar uma produção de anticorpos em humanos e que a infecção por *E. dispar* não causa a mesma produção (Van Doorn *et al.*, 2005), vários testes já foram estudados com a proposta de detectar anticorpos específicos para antígenos de superfície de *E. histolytica*, conseguindo desta forma fazer a importante distinção entre *E. histolytica* e *E. dispar*, além de serem mais sensíveis que o Exame Parasitológico de Fezes. Um anticorpo pesquisado no soro por estes testes, por exemplo, é o anticorpo IgG anti-lectina, já que a Gal/GalNAc lectina é uma proteína da superfície do parasito e já foi evidenciado na mucosa a presença de anticorpo IgA anti-lectina como tentativa de proteção contra a fixação e invasão da mucosa pela *E. histolytica* (Haque *et al.*, 2001).

Como geralmente esta resposta de anticorpos no soro ocorre devido à invasão da mucosa, a detecção de anticorpos acaba se tornando mais útil em pacientes com suspeita de apresentar forma extra-intestinal da amebíase, principalmente nos casos em que esses pacientes não apresentam parasitos detectáveis nas fezes. Em pacientes com abscesso hepático amebiano, a sensibilidade da detecção de anticorpos no soro, por exemplo, é de aproximadamente 100% (Zengzhu *et al.*, 1999).

No entanto, a sua aplicabilidade é mais importante em regiões onde a doença não é endêmica, ocorrendo a infecção somente em grupos específicos como homossexuais, imigrantes de regiões endêmicas e indivíduos que acabaram de retornar de alguma

viagem a um país onde a *E. histolytica* é endêmica. Nesses países, uma alta titulação de anticorpos específicos para o parasito geralmente tem correlação com infecção atual, o que não ocorre em regiões endêmicas e por isso é evitada, visto que muitas vezes a titulação no soro de um indivíduo nestas regiões não permite diferenciar se é decorrente de uma infecção recente ou passada devido à possibilidade de repetidas exposições desses indivíduos ao agente (Tanyuksel & Petri, 2003). Então, os testes sorológicos podem ser uma ferramenta de auxílio no diagnóstico da doença, mas deve ser utilizada também alguma técnica que evidencie a presença do parasito ou uma técnica de imagem que evidencie a lesão.

1.5.5 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

Outras técnicas têm sido alvo de estudo para a utilização no diagnóstico da amebíase, principalmente no campo da biologia molecular. A reação em cadeia da polimerase, ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*), é um método sensível e específico no diagnóstico de amebíase intestinal, mas ainda considerado por alguns estudos como uma técnica com certas desvantagens, como o tempo superior do que o gasto em alguns ensaios imunoenzimáticos e o custo. Por isso, a sua implantação na rotina laboratorial de países em desenvolvimento onde a amebíase é endêmica ainda não é uma realidade (Fotedar *et al.*, 2007). Contudo, a PCR poderá se tornar uma excelente opção como técnica diagnóstica desta infecção devido a sua maior sensibilidade, sendo até 100 vezes mais sensível que as técnicas de detecção de antígeno (Mirelman *et al.*, 1997). Os argumentos acerca de suas desvantagens carecem de uma nova avaliação devido às recentes melhorias na automação, a simplificação crescente que vem ocorrendo nos métodos de PCR, à diminuição nos preços de equipamentos e reagentes, além do desenvolvimento de novos sistemas de detecção (Nuñez *et al.*, 2001).

A PCR é um método que reside na amplificação “in vitro” de uma seqüência específica de DNA, sendo o procedimento composto por uma etapa inicial de desnaturação inicial, seguida por vários ciclos repetitivos de três etapas básicas

(desnaturação das fitas do DNA, hibridização dos iniciadores e extensão do novo fragmento) que ocorrem em diferentes temperaturas de incubação, em um mesmo microtubo de reação e com reagentes termoestáveis, posteriormente ocorrendo uma etapa final em que é feita uma extensão final dos produtos de amplificação.

A preservação da amostra é um fator primordial, para evitar que o DNA seja degradado por enzimas digestivas presentes nas fezes. Deve-se ressaltar os cuidados nos métodos de extração de DNA das amostras de fezes e na escolha dos iniciadores específicos (*primers*) para se ter sucesso na padronização da técnica (Tanyuksel & Petri, 2003).

A PCR como ferramenta de detecção de espécies de *Entamoeba* apresenta algumas variações específicas de método além da PCR convencional, como a *nested* PCR, a PCR-SHELA (*PCR solution hybridisation enzyme linked immunoassay*), a Multiplex-PCR e a PCR Tempo Real.

A *nested* PCR geralmente é usado para aumentar a sensibilidade do método visto que a quantidade de DNA do parasito nas fezes é bastante reduzida em alguns casos, então neste método são realizadas duas amplificações: a primeira reação de amplificação é realizada utilizando iniciadores gênero-específicos, apenas para aumentar a concentração de DNA a um nível que torne possível a amplificação bem sucedida com iniciadores espécie-específicos, elevando, então, o DNA a níveis detectáveis pela coloração com brometo de etídio em gel de agarose (Khainar *et al.*, 2007).

A PCR-SHELA é um método colorimétrico baseado no ELISA utilizado para a detecção dos produtos de amplificação, sendo possível visualizar os resultados finais ou utilizar a leitura por fotolorimetria (Furrows *et al.*, 2004).

Outra variante da técnica é a Multiplex-PCR, no qual a variação é o uso de iniciadores específicos para duas ou mais espécies de *Entamoeba* no mesmo tubo de reação para que haja a amplificação do DNA dessas espécies caso estejam presentes na amostra, fornecendo então um diagnóstico diferencial de cada amostra testada.

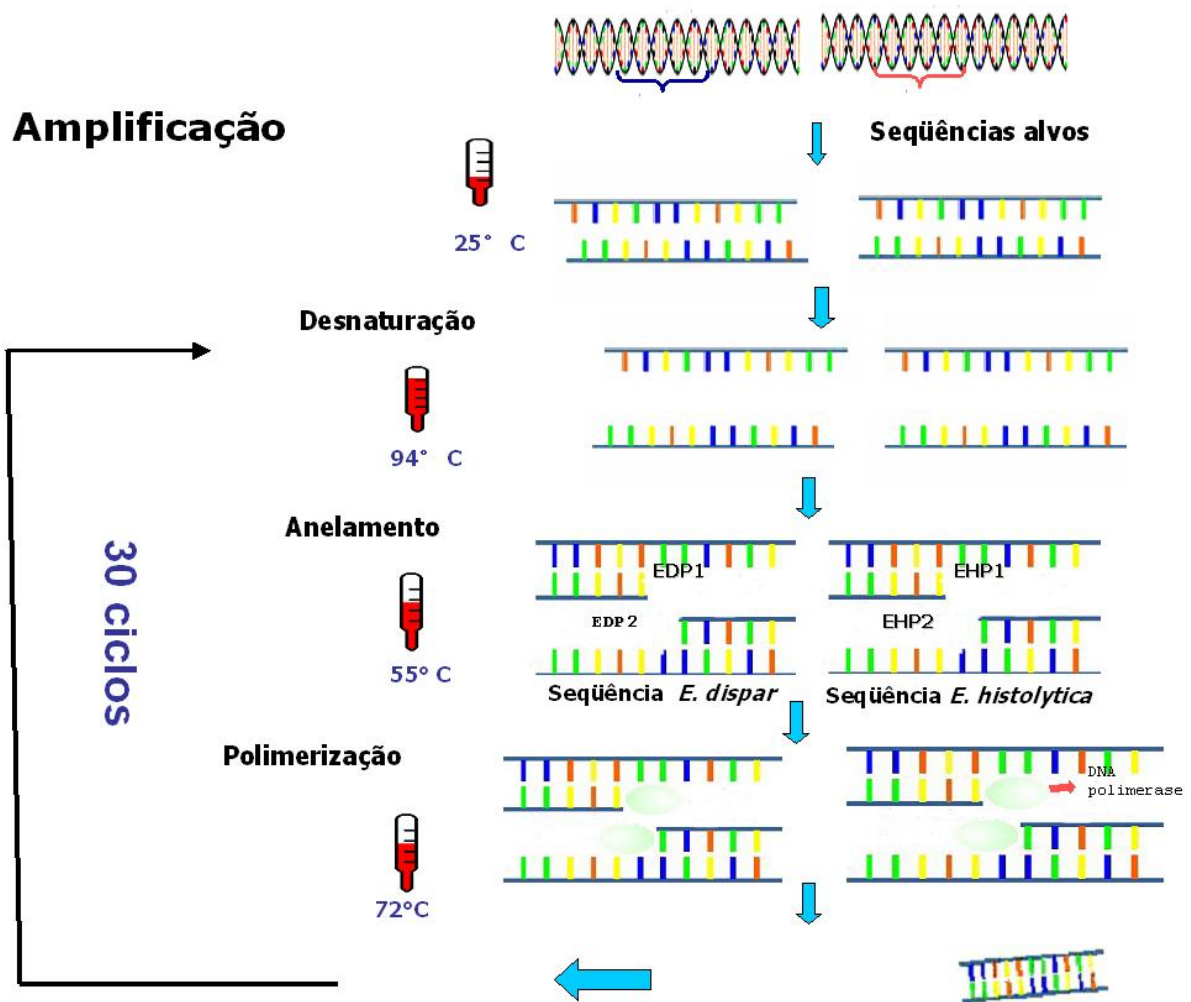


Figura 7: Esquema simplificado da reação de Multiplex-PCR (Fonte: Santos, 2006)

A Multiplex-PCR, por permitir o diagnóstico diferencial do complexo *E. histolytica*/*E. dispar* ao amplificar seqüências de DNA de ambas espécies e de tamanhos previamente conhecidos e diferentes entre si, é uma das técnicas escolhidas para o estudo.

1.5.6 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, ou PCR Tempo Real, é uma das mais recentes modalidades de PCR, cuja metodologia emprega marcadores

fluorescentes que são detectados pelo aparelho desenvolvido para esta técnica. A grande vantagem desta técnica é que é possível acompanhar a reação ao passo em que ela ocorre ao invés de se observar o total de DNA amplificado somente ao final da reação. O aparelho relata a ocorrência de amplificação conforme cada tubo emite uma fluorescência, que se torna crescente e é equivalente à quantidade de DNA amplificado, até alcançar uma intensidade que atinja o limiar de reação (Haque *et al.* 2007). Essa metodologia é bastante atrativa para o diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas por ser um ensaio altamente sensível e quantitativo mais do que qualitativo, permitindo inclusive monitorar a carga parasitária da amostra, além de algumas características. Entre essas características estão a eliminação da etapa analítica da eletroforese em gel de agarose após a reação, levando a um menor consumo de tempo da técnica e a minimização do risco de contaminação das instalações do laboratório por produtos de amplificação (*amplicons*), uma vez que toda a análise é feita em um tubo de reação fechado, o que representa uma óbvia vantagem considerando que esta contaminação é a mais frequente causa de resultados falso-positivos nas reações de PCR (Paul *et al.*, 2007; Qvarnstrom *et al.*, 2005). Ademais, dentro da técnica denominada PCR Tempo Real ainda existem sistemas de detecção diferentes, cujas formas de origem das fluorescências empregadas se diferenciam. Dos sistemas mais utilizados temos o SYBR Green I e o Taq Man.

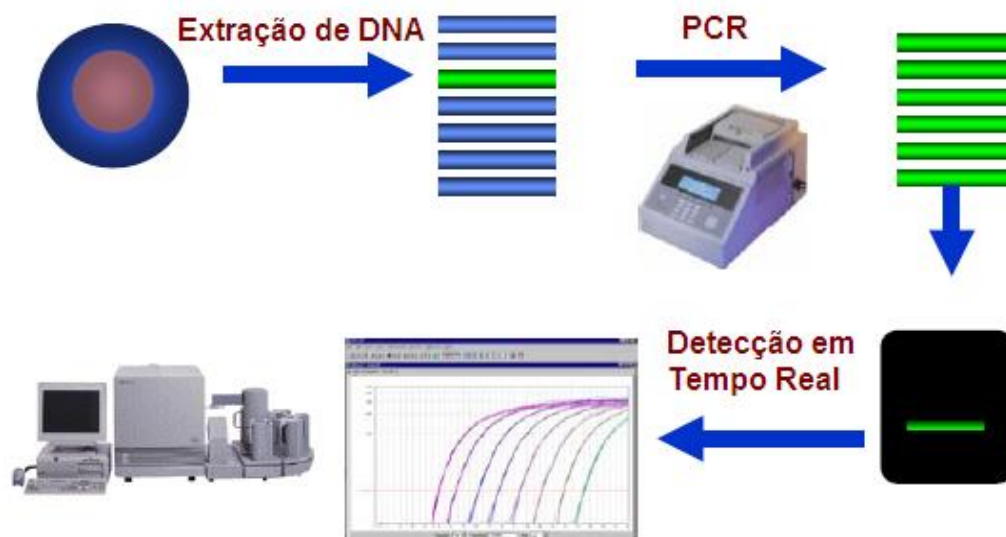


Figura 8: Esquema do procedimento de PCR Tempo Real (Adaptada de versão da Applied Biosystems).

A química do Taq Man se baseia na utilização de sondas fluorogênicas que usam a atividade 5' nuclease da Taq DNA polimerase para detectar produtos específicos de PCR conforme se acumulam ao longo da reação. Neste sistema, o sinal fluorescente das sondas para ser gerado requer a hibridização específica das sondas com a seqüência alvo (Applied Biosystems, 2006).

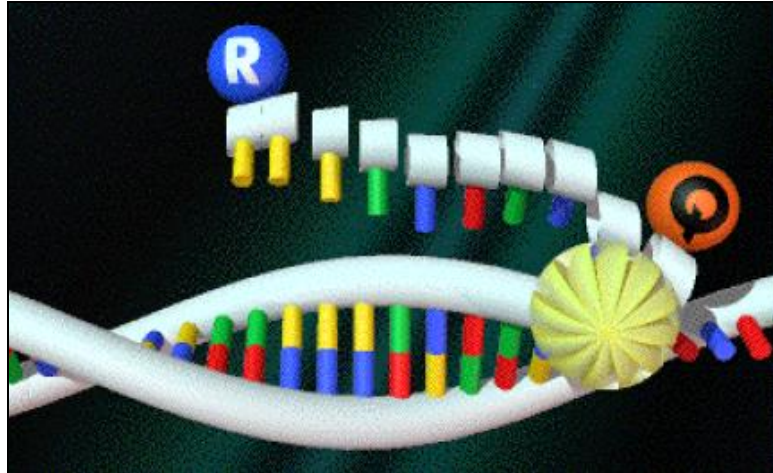


Figura 9: Sonda de Taq Man sendo retirada da seqüência específica conforme a Taq polimerase amplifica o gene codificado pelo *primer* (Fonte: Applied Biosystems)

A química do SYBR Green I usa um intercalador de DNA que é um marcador altamente específico que se liga a moléculas de DNA de fita dupla, detectando os produtos de amplificação conforme eles se acumulam durante os ciclos de PCR.



Figura 10: SYBR Green I se intercalando entre as duas fitas de DNA (Fonte: Applied Biosystems).

A PCR Tempo Real foi a técnica escolhida neste estudo para ser avaliada juntamente com a Multiplex-PCR por permitir a obtenção de uma maior sensibilidade e resultados mais rápidos devido à exclusão de uma das etapas da PCR convencional, o gel de agarose.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização de uma Multiplex-PCR e de uma PCR em Tempo Real no diagnóstico diferencial de *E. histolytica* e *E. dispar* nas amostras onde foram encontrados cistos do complexo *E. histolytica/E. dispar*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diferenciar por “Multiplex-PCR” as espécies *E. histolytica* e *E. dispar* em amostras de fezes humanas.
- Padronizar a técnica de PCR em Tempo Real SYBR Green I para diferenciação do complexo *E. histolytica/ E. dispar* empregando os mesmos iniciadores usados no Multiplex-PCR.

3 METODOLOGIA

3.1 AMOSTRAGEM

As amostras fecais utilizadas nesse projeto são 24 amostras positivas para o complexo *E. histolytica/E. dispar* provenientes de 97 indivíduos de ambos os sexos e com idade variando entre 1 a 70 anos, distribuídos em 38 residências presentes no projeto de assentamento Frei Vantuy, localizado na cidade de São Jorge dos Ilhéus (Latitude: 14°47'6.64"S Longitude: 39°2'16.83"O), região Sul do Estado da Bahia (462 Km da capital, Salvador). A obtenção das amostras foi feita após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, seguida da aplicação de um questionário contendo informações sobre sexo, idade, origem da água consumida, destino dos dejetos, pavimentação das moradias, entre outros. Então, foi feita a distribuição de frascos coletores limpos e secos, seguida de orientação sobre como proceder à coleta e armazenagem das fezes. Após os frascos serem recolhidos, essas amostras seguiram sob refrigeração para o Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz, onde foram feitas alíquotas, sendo então transportadas para o Laboratório de Parasitologia do Hospital Universitário Antônio Pedro da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, onde foram processadas para a realização do exame parasitológico de fezes. O exame parasitológico de fezes foi realizado pela aluna de doutorado Luci Ana Fernandes Martins através do conjunto diagnóstico Paratest® – Diagnostek de acordo com as instruções do fabricante. Foi transferida, com o auxílio de uma pá, cerca de 1 grama de

cada amostra fecal para um frasco do fabricante contendo formol 5% tamponado e posteriormente homogeneizada, então preparou-se uma lâmina com uma gota do sedimento fecal acrescido do corante temporário Lugol, sendo esta submetida à observação por microscopia óptica (microscópio Nikon Eclipse E20). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP) – UFF, protocolo Nº 020/07.

3.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR

3.2.1 Extração de DNA

A extração do DNA foi feita segundo Santos et al. (2007). Cerca de 1g de fezes foi dissolvido em água e filtrado em gaze. O filtrado foi lavado três vezes por centrifugação e o sedimento ressuspensão em 1,0 mL de água. Adicionou-se a 100 µL do sedimento de fezes, 500 µL da solução de tiocianato de guanidina 5M, seguido de agitação manual por cinco minutos e incubação a temperatura ambiente por dez minutos. O lisado foi resfriado em gelo por dois minutos, depois adicionou-se 250 µL de acetato de amônio 7,5 M, agitando em seguida os tubos várias vezes por inversão e incubou-se no gelo por mais dez minutos. O volume de 500 µL de uma solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) foi adicionado e agitou-se como descrito acima. A amostra foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos (Microcentrífuga Eppendorf – 5415 C) e a fase aquosa transferida para um novo tubo, onde adicionou-se 0,54 volumes de isopropanol para precipitação do DNA. Seguiu-se uma nova agitação e centrifugação a 6.500 rpm por dois minutos. Foi retirado o sobrenadante e, então, lavados os precipitados cinco vezes com 1,0 ml de etanol a 70%. Após adicionar o álcool, a amostra foi homogeneizada e centrifugada a 7000 rpm durante dois minutos. Esse procedimento foi repetido até terem sido feitas cinco lavagens. Após as lavagens, o tubo foi colocado aberto em estufa de secagem a 37° C por 24 horas. A seguir foram adicionados 50 µL de TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 0,1mM) pH 8,0 e colocado em banho-maria a 58°C ou em estufa de secagem por uma hora para soltar o DNA que

estava aderido à parede do tubo. O DNA extraído foi armazenado a -20° C até a sua utilização.

Para a realização da PCR Tempo Real, as amostras sofreram ainda uma outra etapa de processamento que foi um procedimento de purificação do DNA, realizado com o *QIAquick PCR Purification kit* (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. A alíquota de DNA diluído em solução de TE separada para purificação era colocada em um tubo do tipo *ependorf* com um reagente denominado pelo fabricante como PBI na proporção de 1:5, logo após era feita a homogeneização e então se aplicava a solução resultante numa coluna de purificação previamente colocada dentro de um outro *ependorf* para então ser feita uma centrifugação numa microcentrífuga a 13.000 rpm (17.900 x g) durante 1 minuto. Após esta etapa do procedimento, a coluna era retirada do *ependorf*, e o filtrado que passou pela coluna era então descartado, para em seguida a coluna ser colocada no mesmo tubo *ependorf* e ser aplicado no interior da mesma 750 μ L de um tampão de lavagem denominado PE, seguindo-se uma nova centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto. Ao fim desta centrifugação, a coluna era novamente retirada do *ependorf*, e o filtrado era descartado para a coluna ser recolocada no tubo e ser feita a aplicação de 50 μ L do tampão de eluição, denominado pelo fabricante como EB. Então, após a aplicação era feita a última centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto, na qual o filtrado resultante corresponde a solução de DNA purificada.

3.2.2 Amplificação do DNA

A PCR foi feito segundo Santos e cols. (2007). As seqüências alvo foram amplificadas utilizando um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para cada espécie, baseados na seqüência gênica que codifica a subunidade menor do RNA ribossomal (Núñez e cols., 2001). Para a *E. dispar*, EDP1 (5'ATGGTGAGGTTGTAGCAGAGA 3') e EDP2 (5' CGATATTGACCTAGTACT 3') sendo gerado um produto de 96 pares de bases (pb). Para a *E. histolytica*, EHP1 (5'

CGATTTTCCCAGTAGAAATTA 3') e EHP2 (5' CAAAATGGTCGTCTAGGC 3'), gerando um produto de 132 pb.

Na Multiplex-PCR, o volume total da reação de PCR foi 50 μ L. A mistura de reação foi preparada com 4 μ L da solução a 10 pmoles/ μ L de cada *primer* (EDP1, EDP2, EHP1 E EHP2), 1,5 μ L de MgCl₂ 10 mM, 0,25 μ L de Taq polimerase 5 units/ μ L, 5 μ L de tampão 10X, 1,25 μ L de 50 mM dNTPs, 2,0 μ L de albumina de soro bovino (BSA – Sigma Chem. Co., USA), 22 μ L de água e 2 μ L da solução de DNA extraído. A amplificação do DNA, utilizando-se o termociclador geneAmp PCR system 2400 (Applied Biosystems, CA, USA), foi realizada com uma pré-desnaturação a 94°C por 3 minutos, depois seguida de 30 ciclos, que compreendem uma desnaturação inicial a 94°C por 30 segundos, a hibridização a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Ao final desses ciclos, foi feita uma extensão a 72°C por 7 minutos. Quatro controles foram incluídos em todos os experimentos: 1) controle branco (todos os reagentes exceto o DNA) ; 2) DNA de *E. histolytica* de uma cepa padrão; 3) DNA de *E. dispar* de uma cepa padrão; 4) controle negativo (DNA de outra espécie).

Na PCR Tempo Real, o volume total da reação de PCR foi 25 μ L e a reação de PCR foi feita separadamente para *E. histolytica* e *E. dispar*. A mistura da reação foi preparada com 2,5 μ L da solução a 10 pmoles/ μ L de cada *primer* (EHP1 e EHP2, ou EDP1 e EDP2), 12,5 μ L de SYBR Green Master Mix, 5,5 μ L de água deionizada e 2 μ L da solução de DNA purificado. Na amplificação do DNA, utilizando o termociclador 7500 System (Applied Biosystems, CA, USA), ocorrem 35 ciclos, que compreendem uma etapa de desnaturação por 15 segundos a 95°C seguida de uma etapa de anelamento durante 1 minuto a 55°C. Ao final desses ciclos, ocorreu um outro estágio que corresponde à curva de dissociação (*melting curve*), constituído de 15 segundos a 95°C, seguidos de 1 minuto a 60°C, 15 segundos a 95°C e 15 segundos a 60°C.

3.2.3 Visualização da Amplificação

Na Multiplex-PCR, os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose a 2% imerso em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5 X e foi feita uma eletroforese a 100 V. Após esta eletroforese, o gel foi corado numa solução de Brometo

de Etídio durante 10 minutos e em seguida descorado em água corrente durante 30 minutos para, então, ser feita a visualização das bandas de DNA amplificadas diante de iluminação ultravioleta (UV).

Na PCR Tempo Real, a visualização da amplificação foi feita em um software específico para este método, o 7500 System Software.

4. RESULTADOS

As amostras de fezes humanas foram obtidas de moradores do Projeto de Assentamento Frei Vantuy (São Jorge dos Ilhéus, BA). O exame parasitológico de fezes foi feito previamente a este estudo e identificou a presença de cistos característicos do complexo *E. histolytica/E. dispar* em 24 dessas amostras, as quais foram selecionadas para que fosse feito o diagnóstico diferencial desse complexo, o que possibilitaria identificar a espécie do protozoário, auxiliando na conduta clínica, uma vez que apenas a espécie *E. histolytica* é patogênica e necessita de tratamento para evitar um possível desenvolvimento da doença invasiva, cujos acometimentos podem levar ao óbito do indivíduo doente.

PARASITOLÓGICO DE FEZES

1	<i>Entamoeba coli</i> ; <i>Endolimax nana</i> ; <i>Blastocystis hominis</i> ; complexo <i>E. histolytica/E. dispar</i>
2	<i>Blastocystis hominis</i> ; complexo <i>E. histolytica/E. dispar</i> ; <i>Entamoeba coli</i> ; <i>Ancilostomídeo</i>
3	Complexo <i>E. histolytica/ E. dispar</i> ; <i>Endolimax nana</i>
4	<i>Entamoeba coli</i> ; <i>Blastocystis hominis</i> ; complexo <i>E. histolytica/E. dispar</i> ; <i>Ascaris lumbricoides</i>
5	<i>Entamoeba coli</i> ; complexo <i>E. histolytica/E. dispar</i>
6	Complexo <i>E. histolytica/E. dispar</i>
7	<i>Trichuris trichiura</i> ; complexo <i>E. histolytica/E. dispar</i>
8	<i>Blastocystis hominis</i> ; complexo <i>E. histolytica/E. dispar</i>
9	Complexo <i>E. histolytica/E. dispar</i> ; <i>Endolimax nana</i> ; <i>Trichuris trichiura</i>
10	Complexo <i>E. histolytica/E. dispar</i>
11	<i>Trichuris trichiura</i> ; <i>Ascaris lumbricoides</i> ; <i>Entamoeba coli</i> ; complexo <i>E. histolytica/E. dispar</i> ; <i>Ancilostomídeo</i>
12	<i>Entamoeba coli</i> ; complexo <i>E. histolytica/ E. dispar</i> ; <i>Blastocystis hominis</i> ; <i>Endolimax nana</i>
13	<i>Endolimax nana</i> ; <i>Entamoeba coli</i> ; <i>Entamoeba histolytica</i>
14	<i>Entamoeba coli</i> ; complexo <i>E. histolytica/ E. dispar</i> ; <i>Endolimax nana</i> ; <i>Ascaris lumbricoides</i>
15	<i>Blastocystis hominis</i> ; <i>Endolimax nana</i> ; complexo <i>E. histolytica/ E. dispar</i>
16	<i>Blastocystis hominis</i> ; <i>Endolimax nana</i> ; complexo <i>E. histolytica/ E. dispar</i> ; <i>Entamoeba coli</i>
17	<i>Giardia intestinalis</i> ; complexo <i>E. histolytica/ E. dispar</i> ; <i>Strongyloides stercoralis</i>
18	Complexo <i>E. histolytica/ E. dispar</i> ; <i>Endolimax nana</i> ; <i>Iodamoeba butschilii</i> ; <i>Blastocystis hominis</i>
19	<i>Entamoeba coli</i> ; <i>Endolimax nana</i> ; complexo <i>E. histolytica/ E. dispar</i> ; <i>Ascaris lumbricoides</i>
20	Complexo <i>E. histolytica/ E. dispar</i> ; <i>Endolimax nana</i>
21	<i>Entamoeba coli</i> ; complexo <i>E. histolytica/ E. dispar</i> ; <i>Ascaris lumbricoides</i>
22	<i>Ascaris lumbricoides</i> ; <i>Entamoeba coli</i> ; complexo <i>E. histolytica/ E. dispar</i> ; <i>Giardia intestinalis</i>
23	<i>Blastocystis hominis</i> ; <i>Endolimax nana</i> ; <i>Entamoeba coli</i> ; complexo <i>E. histolytica/ E. dispar</i> ; <i>Trichuris trichiura</i> ; <i>Ancilostomídeo</i>
24	<i>Endolimax nana</i> ; <i>Entamoeba coli</i> ; complexo <i>E. histolytica/ E. dispar</i> ; <i>Ascaris lumbricoides</i> ; <i>Blastocystis hominis</i>

Tabela 1: Resultado do Exame Parasitológico de Fezes realizado anteriormente pela aluna de doutorado Luci Ana Fernandes Martins.

4.1 Multiplex-PCR

A Multiplex-PCR mostrou que os controles, feitos a partir de DNA de cepas padrões de *E. histolytica* e *E. dispar*, apresentaram as suas respectivas bandas visíveis no gel de agarose em localizações diferentes e previamente conhecidas, referentes as seqüências de DNA com tamanhos de 132 pares de bases para *E. histolytica* e 96 pares de bases para *E. dispar*. Dessa forma é possível identificar o DNA amplificado de cada uma das espécies, mesmo que o método seja usado para o diagnóstico de uma infecção mista.

O método da Multiplex-PCR demonstrou também a presença de DNA de *E. dispar* em seis das 24 amostras testadas (figuras 11, 12 e 13), não havendo amplificação de DNA de *E. histolytica* ou de *E. dispar* nas 18 amostras restantes. Esses resultados levam à busca por uma explicação, visto que todas as amostras testadas haviam sido diagnosticadas previamente como positivas para o complexo *E. histolytica/E. dispar* através da microscopia óptica.

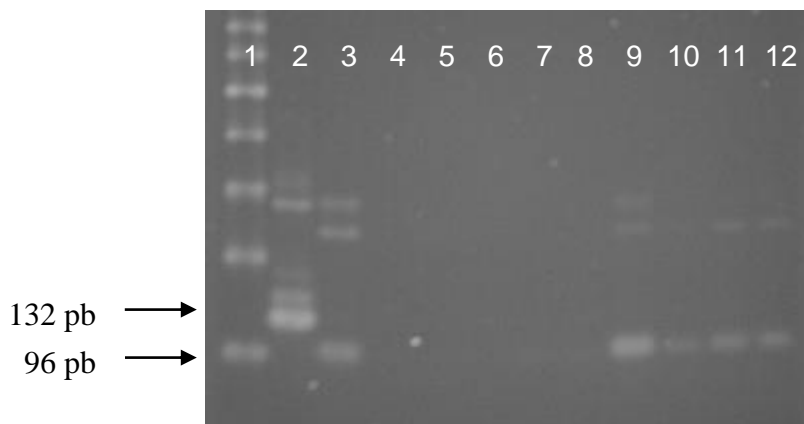


Figura 11: Resultado das amostras pela Multiplex-PCR. 1- Padrão de Peso Molecular, 2- Controle Positivo de *E. histolytica*, 3- Controle Positivo de *E. dispar*, 4- Controle negativo, 5- Branco, 6- Amostra 1, 7- Amostra 2, 8- Amostra 3, 9- Amostra 4, 10- Amostra 5, 11- Amostra 6 e 12- Amostra 7. As amostras 4, 5, 6 e 7 foram positivas para *E. dispar*. Gel de agarose a 2,0%.

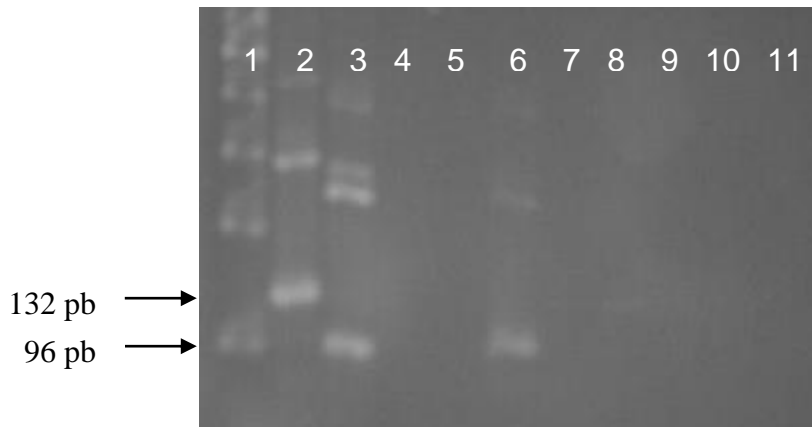


Figura 12: Resultado das amostras pela Multiplex-PCR. 1- Padrão de Peso Molecular, 2- Controle Positivo de *E. histolytica*, 3- Controle Positivo de *E. dispar*, 4- Controle negativo, 5- Branco, 6- Amostra 8, 7- Amostra 9, 8- Amostra 10, 9- Amostra 11, 10- Amostra 12 e 11- Amostra 13. A amostra 8 foi positiva para *E. dispar*. Gel de agarose a 2,0%.

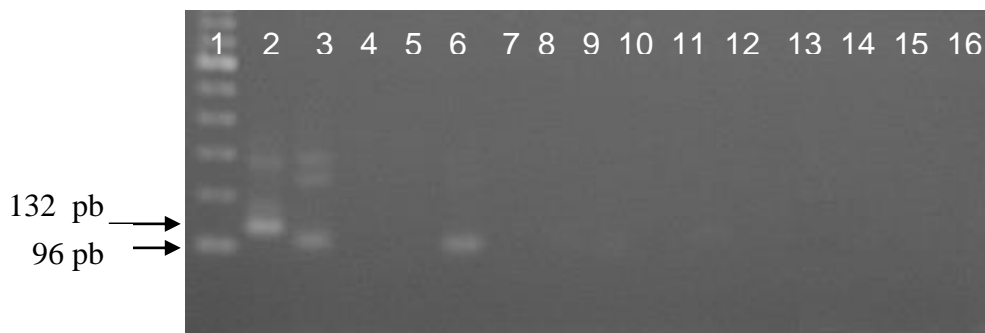


Figura 13: Resultado das amostras pela Multiplex-PCR. 1- Padrão de Peso Molecular, 2- Controle Positivo de *E. histolytica*, 3- Controle Positivo de *E. dispar*, 4- Controle negativo, 5- Branco, 6- Amostra 14, 7- Amostra 15, 8- Amostra 16, 9- Amostra 17, 10- Amostra 18, 11- Amostra 19, 12- Amostra 20, 13- Amostra 21, 14- Amostra 22, 15- Amostra 23 e 16- Amostra 24. A amostra 14 foi positiva para *E. dispar*. Gel de agarose a 2,0%.

4.2 PCR Tempo Real

O primeiro detalhe observado foi o fato de que a amplificação do DNA controle para *E. histolytica* ocorreu à temperatura de dissociação média de aproximadamente 73°C enquanto a amplificação do DNA controle de *E. dispar* ocorreu em cerca de 70°C. Nos experimentos de padronização foram utilizadas amostras de DNA de outras

parasitos e microrganismos (*Giardia lamblia*, *Blastocystis hominnis*, *Candida albicans*, etc.), além do DNA humano, não sendo visto a amplificação nestes casos.

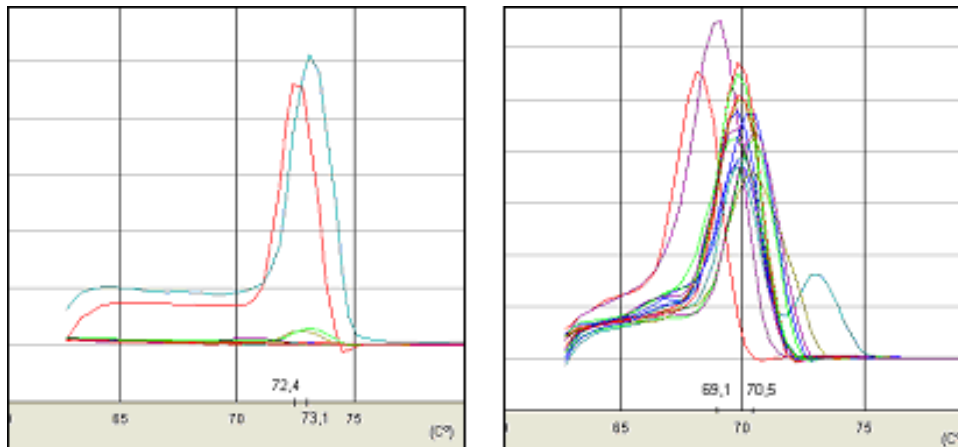


Figura 14: Gráfico das temperaturas de dissociação média da reação de PCR Tempo Real. À esquerda a reação para *E. histolytica*, com valores próximos a 73°C e à direita a reação para *E. dispar* com valores próximos a 70°C

Como o PCR Tempo Real que foi realizado nessas amostras ainda se encontrava em fase de padronização, foram necessários intensivos estudos para se chegar à interpretação considerada mais apropriada para os resultados fornecidos pelo software da técnica. Essa dificuldade ocorreu devido à ocorrência de amplificações possivelmente inespecíficas nos ciclos finais da reação, trazendo a necessidade de se estabelecer uma linha de corte no número de ciclos, na tentativa de se excluir ou diminuir o máximo possível a quantidade de amplificações inespecíficas. Iniciamos a padronização com o programa padrão do aparelho que trabalha com 40 ciclos, mas observamos que com 35 ciclos os resultados eram mais específicos. O PCR convencional (Multiplex-PCR) já utiliza este número de ciclos e ficou estabelecido este programa.

Após esta adaptação, os resultados mostraram que as seis amostras que foram positivas para *E. dispar* pelo Multiplex-PCR foram diagnosticadas também positivas

pelo PCR Tempo Real realizado com *primers* para esta espécie, mas a técnica também diagnosticou como positivas para esta espécie outras sete amostras analisadas. Na reação de PCR Tempo Real realizada com *primers* para *E. histolytica*, apenas uma amostra foi diagnosticada como positiva para esta espécie, e o resultado na reação com *primers* para *E. dispar* foi negativa nesta amostra.

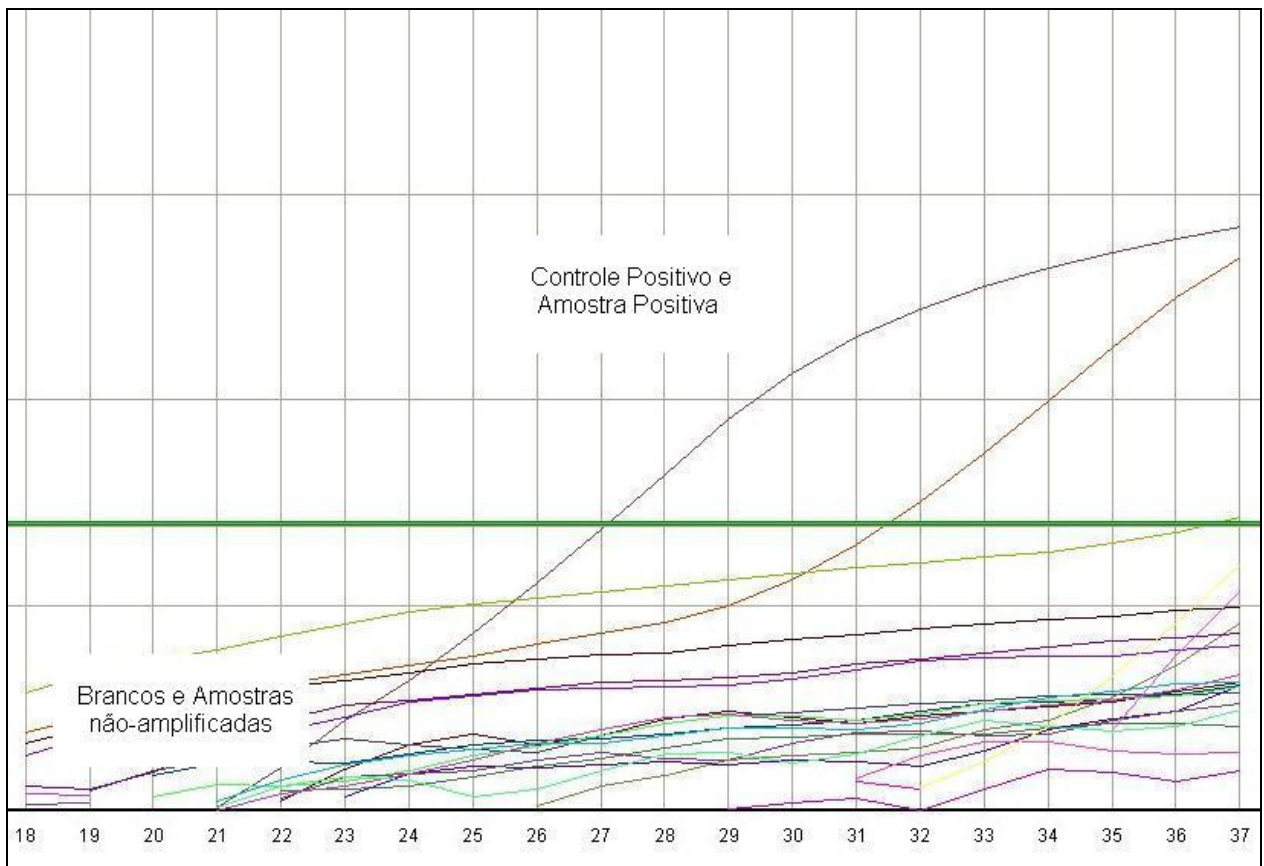


Figura 15: Gráfico da amplificação das amostras pela reação de PCR Tempo Real para a detecção de *E. histolytica*, demonstrando o controle positivo, a amostra positiva e as amostras negativas.

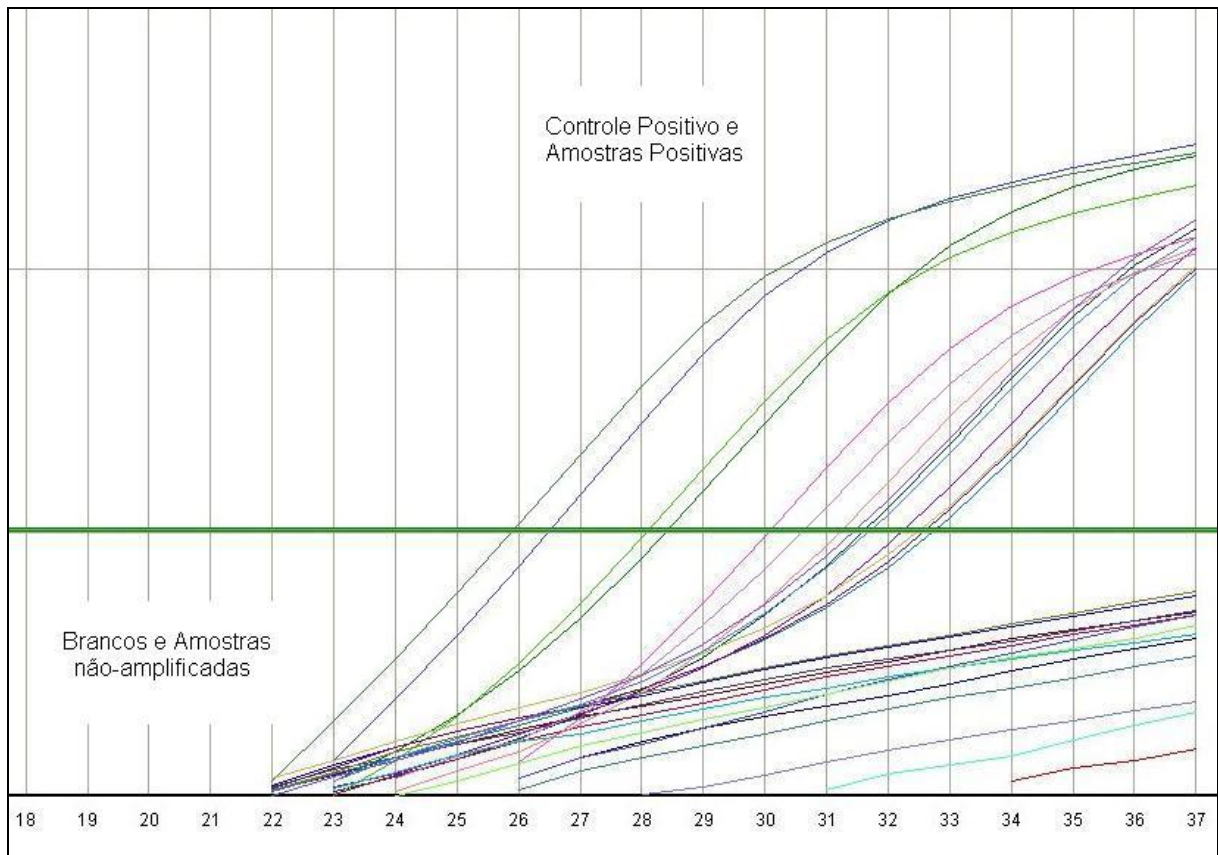


Figura 16: Gráfico da amplificação das amostras pela reação de PCR Tempo Real para a detecção de *E. dispar*, demonstrando o controle positivo, as amostras positivas e as amostras negativas.

Para a confirmação dos resultados obtidos, as amostras foram enviadas à Divisão de Doenças Parasitárias (DPD, CDC, Atlanta, GA, USA.) para ser realizada a reação de PCR em Tempo Real utilizando sondas do tipo Taq Man, que é uma técnica já bem padronizada no CDC (Centers for Disease Control and Prevention).

AMOSTRAS	RT SYBR Green		RT Taqman		Multiplex
	<i>E. histolytica</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>E. dispar</i>	
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+	-
3	-	-	-	-	-
4	-	+	-	+	+ Ed
5	-	+	-	+	+ Ed
6	-	+	-	+	+ Ed
7	-	+	-	+	+ Ed
8	-	+	-	+	+ Ed
9	-	-	-	+	-
10	-	-	-	+	-
11	-	+	-	+	-
12	-	-	-	-	-
13	-	+	NR*	NR*	-
14	-	+	-	+	+ Ed
15	+	-	+	+	-
16	-	+	-	+	-
17	-	+	-	+	-
18	-	-	-	+	-
19	-	-	-	-	-
20	-	+	-	+	-
21	-	-	-	-	-
22	-	+	-	-	-
23	-	-	-	+	-
24	-	+	-	-	-

Tabela 2: Resultados das técnicas de Multiplex-PCR, PCR Tempo Real SYBR Green I e PCR Tempo Real Taq Man. Os resultados do PCR em Tempo Real Taq Man foram fornecidos pela aluna de doutorado do laboratório Helena Lúcia Carneiro Santos, em estágio na Divisão de Doenças Parasitárias (DPD, CDC, Atlanta, GA, USA.). *NR – não reagiu

5. DISCUSSÃO

Desde a descoberta da infecção pela *E. histolytica*, o diagnóstico da doença é feito através do Exame Parasitológico de Fezes (EPF), uma técnica cuja sensibilidade é de aproximadamente 60% e não é capaz de identificar a espécie do protozoário devido a existência uma espécie morfológicamente idêntica, sendo restrita a informar a presença de estruturas do complexo *E. histolytica/E. dispar*. Essa restrição no diagnóstico é um problema para a conduta clínica visto que apenas a *E. histolytica* pode causar doença, levando inclusive a óbito se não houver um tratamento adequado, enquanto a *E. dispar* não é correlacionada a manifestações clínicas em humanos, sendo desnecessário expor o paciente a um tratamento nesses casos. Além desses problemas de sensibilidade e especificidade no diagnóstico, existe ainda a possibilidade de resultados falso-positivos devido a erros diagnósticos dos profissionais diante de cistos de outras amebas morfológicamente semelhantes ou de macrófagos com eritrócitos fagocitados (Stanley *et al.*, 2003).

Devido a esse cenário, a Organização Mundial de Saúde declarou em 1997 a necessidade de se pesquisar novas técnicas diagnósticas para a detecção específica do parasito, diferenciando a espécie encontrada, em busca do surgimento de algum método que possa ser adaptado para a rotina de laboratórios de análises clínicas. Desde então, variadas técnicas foram aperfeiçoadas e algumas outras surgiram com esse intuito, passando algumas delas até a serem comercializadas no formato de conjuntos diagnósticos.

Um exemplo de técnica que já foi adaptada para o formato de conjunto diagnóstico é a detecção de antígeno, que é bastante sensível e já existem alguns testes bastante específicos, feitos para a detecção de antígenos de *E. histolytica*. Entretanto, esta técnica precisa ser realizada em amostras não-fixadas, que estejam frescas ou congeladas, o que nem sempre é possível, se tornando então uma limitação importante da técnica, o que dificulta sua utilização universal em laboratórios clínicos e em levantamentos epidemiológicos (Tanyuksel & Petri, 2003). No Brasil, este conjunto diagnóstico é comercializado com custo extremamente elevado.

Nas técnicas de detecção de anticorpos específicos, a sensibilidade é considerada alta, principalmente em pacientes com doença extra-intestinal, no entanto os testes sorológicos para amebíase são de pouco valor em países localizados em regiões onde a *E. histolytica* é endêmica (Van Doorn *et al.*, 2005) como é o caso do Brasil, visto que os títulos de imunoglobulinas encontrados podem corresponder a infecções recentes ou a infecções passadas que já foram resolucioadas, uma vez que os habitantes dessas regiões podem ter contato com o parasito várias vezes ao longo da vida. Dessa forma, os resultados de testes sorológicos isoladamente têm um significado clínico limitado nessas regiões, sendo basicamente uma ferramenta de auxílio, confirmando-se o diagnóstico apenas após a evidenciação da presença do parasito através de alguma outra técnica, como o PCR ou a detecção de antígeno, cujos métodos evidenciam, respectivamente, a presença de DNA e a existência de proteínas do parasito no material analisado.

Devido a possibilidade de evidenciar a presença de DNA do parasito e pela sensibilidade obtida com a utilização de *primers* que codifiquem o gene da subunidade menor do RNA ribossomal (Fotedar *et al.*, 2007), foi decidido avaliar a PCR no diagnóstico diferencial do complexo *E. histolytica/E. dispar*. Nesta técnica, os *primers* utilizados codificam seqüências específicas para cada espécie, nesse gene, e que apresentam tamanhos diferentes, possibilitando a diferenciação das espécies no gel de agarose, constituindo uma Multiplex-PCR (Nuñes *et al.*, 2001).

Após a realização das reações de PCR, observou-se a amplificação de fragmentos de DNA com 96 pb em 6 amostras dentre as 24 testadas, fornecendo o diagnóstico da presença de *E. dispar* nas mesmas. No entanto, não houve amplificação

de fragmentos de DNA com 132 pb em nenhuma amostra, descartando segundo esta técnica a infecção por *E. histolytica* nos indivíduos que forneceram as amostras de fezes. Como em todo o material testado foram observadas estruturas (principalmente cistos) do complexo *E. histolytica*/*E. dispar*, esse resultado gerou a hipótese de que talvez fosse necessária a utilização de técnicas de maior sensibilidade, visto que muitas vezes os cistos estão em quantidade tão baixa na amostra que a quantidade de DNA amplificado após a reação de PCR ainda se encontra abaixo do limite de detecção pela coloração com brometo de etídio no gel de agarose. A *nested* PCR muitas vezes é escolhido pelos pesquisadores devido a essa dificuldade de diagnóstico em infecções como a amebíase, necessitando de uma etapa inicial de amplificação gênero-específica apenas para que a quantidade de DNA seja elevada de forma que alcance níveis detectáveis quando for feita a reação de PCR espécie-específica (Khainar *et al.*, 2007).

A PCR Tempo Real é uma outra opção de técnica, que mesmo em suas formas de detecção menos sensíveis, ainda é cerca de 10 vezes mais sensível que a PCR convencional (Qvarnstrom *et al.*, 2005). Neste estudo foi realizado a PCR Tempo Real SYBR Green I nas mesmas amostras que foram testadas pela Multiplex-PCR. A escolha da PCR Tempo Real SYBR Green I ocorreu devido a esta ser uma técnica de menor custo se comparada à reação de PCR Tempo Real Taq Man. O primeiro detalhe observado foi a confirmação da amplificação de fragmentos de DNA correspondentes a *E. dispar* nas seis amostras que foram positivas pela Multiplex-PCR, no entanto este método detectou mais sete amostras além das citadas acima como positivas para *E. dispar*. Outro detalhe observado foi a amplificação de DNA de *E. histolytica* em uma amostra, dado que não foi observado pela Multiplex-PCR. Esses resultados estão coerentes, devido ao fato de que a PCR Tempo Real é mais sensível que a PCR convencional, com o primeiro conseguindo detectar os produtos da amplificação de DNA mesmo quando a quantidade inicial na amostra é extremamente baixa.

A oportunidade do nosso grupo testar as mesmas amostras utilizando um sistema de detecção diferente na PCR Tempo Real (Taq Man) possibilitou a comparação dos resultados e das condições, ressaltando detalhes que favoreceram na interpretação dos resultados dessa técnica que ainda está sendo padronizada.

Comparando os resultados obtidos na PCR Tempo Real pelos sistemas de detecção SYBR Green I e Taq Man, observou-se uma boa correlação entre os resultados obtidos pelas duas técnicas. No entanto, as reações com *primers* de *E. dispar* tiveram algumas variações entre os resultados positivos, possivelmente devido às diferenças nos seus sistemas de detecção da amplificação. Os resultados positivos apenas pelo método do Taq Man podem ser explicados por esta ser considerada uma técnica mais sensível e específica devido às sondas que se ligam a seqüências específicas no gene que será amplificado pela enzima Taq polimerase, além de que foram usadas alíquotas diferentes das utilizadas no método do SYBR Green I. Por outro lado, os resultados positivos somente pelo método do SYBR Green podem estar relacionados a uma concentração mais otimizada de marcadores SYBR Green I do que no ensaio feito com Taq Man, sendo este último muito específico e precisar de uma concentração bem padronizada na reação, ou podem estar relacionados também a uma contaminação por moléculas de DNA diferentes das moléculas amplificadas, uma vez que o SYBR Green I é um intercalador de DNA, se ligando a qualquer molécula de DNA dupla fita a que for exposto.

Devido às características desses sistemas, a literatura considera que apenas o sistema Taq Man pode ser adaptado para uma técnica Multiplex, já que pode utilizar tipos de sondas diferentes para cada espécie investigada na reação. Contudo, foram observadas temperaturas de dissociação média diferentes para as duas espécies testadas, com essa temperatura correspondendo a aproximadamente 70°C para *E. dispar* e 73°C para *E. histolytica*, o que traz a possibilidade de ser padronizada uma técnica multiplex para essas espécies com SYBR Green I em estudos futuros.

Quanto às cinco amostras diagnosticadas negativas pelos três métodos (Multiplex-PCR, PCR Tempo Real SYBR Green I e PCR Tempo Real Taq Man), outras hipóteses têm de ser investigadas, visto que elas foram diagnosticadas como positivas para o complexo *E. histolytica/E. dispar* pelo EPF. Uma hipótese para este fato é a ocorrência de resultados negativos devido à presença de cistos de outras espécies de ameba morfologicamente semelhantes. Uma outra hipótese é a presença de poucas estruturas pertencentes às duas espécies no material analisado e, conseqüentemente, uma concentração muito baixa de DNA na amostra, resultando em uma concentração

de produtos de amplificação tão ínfima que nenhuma dessas técnicas conseguiu detectar uma amplificação significativa. Uma terceira hipótese é a possibilidade do procedimento de extração ter apresentado baixo rendimento, o que pode estar associado a uma possível presença de inibidores em algumas amostras de fezes e, no caso da PCR Tempo Real, à necessidade de uma etapa de purificação das amostras para a realização da técnica também tem como consequência uma diminuição do rendimento do processo de extração. Desta forma, o processo de extração pode fornecer uma baixa concentração de DNA dentre a quantidade que estava presente nessas amostras, com as três técnicas sendo incapazes de detectar uma amplificação significativa neste caso.

6. CONCLUSÕES

As duas técnicas avaliadas apresentaram uma excelente especificidade. No entanto, a sensibilidade da técnica de PCR Tempo Real se mostrou consideravelmente maior em relação ao Multiplex-PCR, fato que já era esperado de acordo com os dados da literatura.

Com o rápido e progressivo avanço nas técnicas moleculares, principalmente de PCR, essas técnicas em breve estarão ao alcance de muitos países, podendo ser utilizada inclusive na rotina laboratorial assim que houverem protocolos completamente padronizados. Essas técnicas utilizadas neste estudo são novas e antes de pensar em novas mudanças no protocolo, devem ser feitas outras técnicas para confirmarem as hipóteses apontadas ao fim da discussão. Contudo, a eficiência dos métodos já demonstra que essas técnicas são boas escolhas para a realização de testes diagnósticos para futuramente serem realizadas em laboratórios clínicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERS, J.P. **The diagnostic implications of the separation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*.** J. Biosci. 27 (6): Suppl 3: 573-578, 2002.

ACKERS, J.P. AND MIRELMAN, D. **Progress in research on *Entamoeba histolytica* pathogenesis.** Current Opinion in Microbiology, 9: 367-373, 2006.

ALI, I.K.M.; CLARK, C.G.; PETRI Jr, W.A. **Molecular epidemiology of amebiasis.** Infection, Genetics and Evolution, 8: p. 698-707, 2008.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Essentials of Real Time PCR.** Applied Biosystems, 2006.

BLANC, D. & SARGEANT, P.G. ***Entamoeba histolytica* Zymodemes: Exhibition γ and δ Bands only of Glucose Phosphate Isomerase and Phosphoglucomutase May Be Influenced by Starch in The Medium.** Exp Parasitol, 72 : 87-90, 1991.

BLESSMANN, J.; BUSS, H.; TON NU, P.A.; DINH, B.T.; VIET NGO, Q.T.. LE VAN, A.; ABD ALLA, M.D.; JACKSON, T.F.H.G.; RAVDIN, J.I. AND TANNICH, E. **Real-Time PCR for Detection and Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Fecal Samples.** Journal of Clinical Microbiology, 40(12): 4413-4417, Dec. 2002.

CÁCERES, F.R.; MIRANDA, R.U. **Determinacion de Anticuerpos Anti-*Entamoeba histolytica* mediante inmunofluorescencia indirecta en pacientes con pruebas hepaticas alteradas.** Talca, 2004. Tesis para optar al grado de licenciado en tecnologia médica. Universidad de Talca.

CHACÍN-BONILLA, L. **Relevancia del Reconocimiento de *Entamoeba Dispar* en la Amibiasis.** Invest. Clín., vol.42, no.3, p.157-160. Set. 2001.

CHENG, X.; HUGHES, M.A.; HUSTON C.D.; LOFTUS, B.; GILCHRIST, C.A.; LOCKHART, L.A.; GHOSH, S.; MILLER-SIMS, V.; MANN, B.J., PETRI Jr., W.A. AND TACHIBANA, H. **Intermediate Subunit of the Gal/GalNAc Lectin of *Entamoeba***

***histolytica* Is a Member of a Gene Family Containing Multiple CXXC Sequences Motifs.** Infection and Immunity, 69: 5892-5898, Sept. 2001.

DELIALIOGLU, N.; ASLAN, G.; OZTURK, C.; OZTURHAN, H.; SEN, S. AND EMEKDAS, G. **Detection of *Entamoeba histolytica* antigen in Stool Samples in Mersin, Turkey.** J. Parasitol., 94(2): p. 530-532, 2008.

DIAMOND L.S, CLARK CG. **A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn. (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925.** J Eukaryot Microbiol, 40: 34&344, 1993.

FOTEDAR, R.; STARK, D.; BEEBE, N.; MARRIOTT, D.; ELLIS, J. AND HANRKNES, J. **PCR Detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in Stool Samples from Sydney, Australia.** Journal of Clinical Microbiology, 45(3): 1035-1037, Mar.,2007.

FOTEDAR, R.; STARK, D.; BEEBE, N.; MARRIOTT, D.; ELLIS, J. AND HARKNESS, J. **Laboratory Diagnostic Techniques for *Entamoeba* Species.** Clinical Microbiology Reviews, 20: 511-532, July 2007.

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

GONIN, P. AND 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, January 2003.

HAMZAH, Z.; SONGSAK, P.; MUNGTHIN, M.; LEELAYOOVA, S. AND ALITSEWINKOON-PETMITR, P. **Differential Detection Of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* by a Single-Round PCR Assay.** Journal of Clinical Microbiology, 44(9): 3196-3200, Sept., 2006.

HAQUE, R.; ALI, I.K.M.; AKTHER, S. AND PETRI Jr., W.A. **Comparison of PCR, Isoenzyme Analysis, and Antigen Detection for Diagnosis of *Entamoeba histolytica* Infection.** Journal of Clinical Microbiology, 36: p. 449-452, Feb. 1998.

HAQUE, R.; ALI, I.M.; SACK, R.B.; FARR, B.M.; RAMAKRISHMAN, G. AND PETRI Jr., W.A. **Amebiasis and Mucosal IgA Antibody against the *Entamoeba histolytica* Adherence Lectin in Bangladesh Children.** The Journal of Infectious Diseases, 183: 1787-1793, 2001.

HAQUE, R.; ROY, S.; SIDDIQUE, A.; MONDAL, U.; RAHMAN, S.M.M.; MONDAL, D.; HOUP, E. AND PETRI Jr., W.A. **Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia Intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp.** Am. J. Trop. Med. Hyg., 76(4): 713-717, 2007.

JACKSON, T.F.H.G. ***Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence.**

International Journal for Parasitology, 28: 181-186, 1998.

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

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH, A.R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PEGE, F.C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F.G. **A newly revised classification of protozoa.** The Committee on Systematics and Evolution of the Society of Protozoologists. J. Protozol, 27 (1): 37-58, 1980.

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(9): 2045-2047, Sept. 1997.

NÚÑES, Y.O.; FERNÁNDES, M.A.; TORRES-NÚÑES, D.; SILVA, J.A.; MONTANO, I.; MAESTRE, J.L. AND FONTE, L. **Multiplex Polymerase Chain Reaction Amplification and Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* DNA from Stool Samples.** The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 64: 293-297, 2001.

PAUL, J.; SRIVASTAVA, S.; BHATTACHARVA, S. **Molecular methods for diagnosis of *Entamoeba histolytica* in a clinical setting: An overview.** Experimental Parasitology, 116: 35-43, 2007.

PURIM, S.G. **Expressão Gênica e Introdução ao PCR Quantitativo.** Applied Biosystems, 2006.

QVARNSTROM, Y.; JAMES, C.; XAYAVONG, M.; HOLLOWAY, B.P.; VISVESVARA, G.S.; SRIRISM, R. AND DA SILVA, A.J. **Comparison of Real-Time PCR Protocols for Differential Laboratory Diagnosis of Amebiasis.** Journal of Clinical Microbiology, 43(11): p. 5491-5497, Nov. 2005.

REY, L. **Parasitologia Médica.** 3ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001. p. 278-309

ROY, S.; KABIR, M.; MONDAL, D.; ALI, I.K.M.; PETRI JR, W.A. AND HAQUE, R. **Real-Time-PCR Assay for Diagnosis of *Entamoeba histolytica* Infection.** Journal of Clinical Microbiology, 43(5): 2168-2172, May 2005.

SALLES, J.M.; MORAES, L.A. AND SALLES, M.C. **Hepatic Amebiasis** The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 7 (2): 96-110, 2003.

SANTOS, H.L.C. **DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA AMEBÍASE: Detecção e diferenciação simultânea da *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* por Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e Multiplex-PCR.** Niterói, 2005. 87 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental – Curso de Pós-Graduação em Patologia). Universidade Federal Fluminense

SANTOS, H.L.C.; PERALTA, R.H.S.; MACEDO, H.W.; BARRETO, M.G.M. AND PERALTA, J.M. **Comparison of Multiplex-PCR and Antigen Detection for Differential Diagnosis of *Entamoeba histolytica*.** The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 11: p. 365-370, 2007.

STANLEY JR, S.L. **Amoebiasis.** The Lancet, 361: 1025-1034, March, 2003.

STAUFFER, W. AND RAVDIN, J.I. ***Entamoeba histolytica*: an update.** Current Opinion in Infection Diseases. 16: 479-485, 2003.

TANNICH, E.; HORSTMANN, R.D.; KNOBLOCH, J. AND ARNOLD, H.H. **Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*.** Proc. Natl. Acad. Sci. Vol 86: pp 5118-5122, July 1989.

TANYUKSEL, M. ; PETRI JR, W. A. **Laboratory Diagnosis of Amoebiasis.** Clinical Microbiology Reviews, 16: p. 713-729, October, 2003.

VAN DOORN, H.R.; HOFWEGEN, H.; KOELEWIJN, R.; GILIS, H.; PEEK, R.; WETSTEYN, J.C.F.M.; VAN GENDEREN, P.J.J.; VERVOOT, T. AND 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: p. 4801-4806, Sept. 2005.

VAN HAL, S. J.; STARK, D.J.; FOTEDAR, R.; MARRIOTT, D.; ELLIS, J.T. AND HARKNESS, J.L. **Amoebiasis: current status in Australia.** CLINICAL UPDATE, 186: 412-416, April, 2007.

VERWEIJ, J.J.; OOSTVOGEL, F.; BRIENEN, E.A.T.; NANG-BEIFUBAH, A.; ZIEM, J. AND POLDERMAN, A.M. **Prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in northern Ghana.** Tropical Medicine and International Health, 8(12): 1153-1156, December, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Amoebiasis.** Weekly Epidemiological Record, 72: 97–99, 1997.

ZENGZHU, G.; BRACHA, R.; NUCHAMOWITZ, Y.; CHENG-I, W. AND MIRELMAN, D. **Analysis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and PCR of Human Liver Abscess Aspirates from Patients in China for *Entamoeba histolytica*.** Journal of Clinical Microbiology, 37(9): p. 3034-3036, Sept. 1999.