

IASMIN DE ALBUQUERQUE CAVALCANTI DUARTE

**PREVALÊNCIA DA *Entamoeba histolytica* EM
ALUNOS DE ESCOLAS PÚBLICAS DA CIDADE
DE MACEIÓ**

Recife, 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**PREVALÊNCIA DA *Entamoeba histolytica* EM
ALUNOS DE ESCOLAS PÚBLICAS DA CIDADE
DE MACEIÓ**

IASMIN DE ALBUQUERQUE CAVALCANTI DUARTE

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Amélia Vieira Maciel

Tese apresentada ao colegiado do Curso do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical na área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Recife, 2006

Duarte, Iasmin de Albuquerque Cavalcanti

Prevalência da *Entamoeba histolytica* em alunos de escolas públicas da cidade de Maceió / Iasmin de Albuquerque Cavalcanti Duarte. – Recife : O Autor, 2006.

79 folhas : il., fig., tab., quadro.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2006.

Inclui bibliografia, anexo e apêndice.

1. Medicina tropical – Parasitologia – Amebíase. 2. *Entamoeba histolytica* – Prevalência e diagnóstico. 3. Maceió (AL) – Enteroparasitoses – *Entamoeba dispar* – Prevalência. I. Título.

**616.34
616.936**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
BC2006-570**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL – MESTRADO E DOUTORADO

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DA DOUTORANDA

IASMIN DE ALBUQUERQUE CAVALCANTI DUARTE

No dia 05 de setembro de 2006, às 08h30, na Sala 01 do Edif. das Pós-Graduações da Área Médica, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (C.C.S./UFPE), os Professores: **Profa. Dra. Eliana Maria Maurício da Rocha** (Depto. de Patologia da UFAL – Membro Externo), **Prof. Dr. Gilberto Fontes** (Depto. de Patologia da UFAL – Membro Externo), **Profa. Dra. Gisélia Alves Pontes da Silva** (Depto. Materno Infantil da UFPE – Membro Externo), **Prof. Dr. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes** (Depto. de Medicina Tropical da UFPE – Membro Interno), **Profa. Dra. Vera Magalhães da Silveira** (Depto. de Medicina Tropical da UFPE – Membro Interno), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, argüíram a doutoranda **Iasmin de Albuquerque Cavalcanti Duarte** sobre a sua Tese intitulada “**Prevalência da *Entamoeba histolytica* em alunos de escolas públicas da cidade de Maceió**”. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da doutoranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Profa. Dra. Eliana Maria Maurício da Rocha

Aprovado

Prof. Dr. Gilberto Fontes

Aprovado.

Profa. Dra. Gisélia Alves Pontes da Silva

Aprovado

Prof. Dr. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Aprovado

Profa. Dra. Vera Magalhães da Silveira

APROVADA

Eliana

Profa. Dra. Eliana Maria Maurício da Rocha

Gilberto Fontes

Prof. Dr. Gilberto Fontes

Gisélia Alves Pontes da Silva

Profa. Dra. Gisélia Alves Pontes da Silva

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Prof. Dr. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Vera Magalhães da Silveira

Profa. Dra. Vera Magalhães da Silveira

DEDICATÓRIA

A **Jesus**, meu Senhor, pelo ânimo
e a alegria da sua presença;

A **Paulo César**, meu amado esposo
“não é sem razão que todos te amam”

A **Betoca, Minzinha e Daninho**, os meus maravilhosos
filhos,

Eu não poderia ser uma mãe mais orgulhosa!

A **Betinha** , minha carinhosa mãe
pelo seu maravilhoso amor de mãe

A **Ernani**, meu pai (*in memorium*)
“ depois vem a saudade”

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Ricardo Ximenes (eu nunca poderia chamá-lo de outra forma) pela sua orientação constante e extraordinária competência.

À Prof^a. Maria Amélia Maciel, minha orientadora, pelo apoio e força em todo o tempo.

À Prof^a. Ivanise Aca, que deu todo o alicerce para esta pesquisa se cumprir.

Ao casal de professores Eliana Rocha e Gilberto Fontes, uma das minhas maiores descobertas neste tempo de estudo, grandes luzeiros da nossa UFAL. Vocês iluminam não só pelos que vocês sabem, mas pelo que vocês são.

Ao Prof. Luis Fonte Galindo, um grande presente de Deus, que em seu desprendimento permitiu completar esta pesquisa.

A FAPEAL e ao CNPQ, pelo apoio financeiro, em momentos diferentes, que tornou possível o vai e vem para Recife. A Betânia, da FAPEAL, e à Neide, da PROPEP, pela gentileza no atendimento.

Ao Laboratório TechLab, representado por Sarah Buss e Joel Herbein pelo apoio e prontidão em todos os contatos, essencial para execução da tese.

A Telma, minha assistente e meu braço direito de muitas horas

Aos meus amigos do LACEN, pessoal que convivi durante um ano, pela presteza durante todo tempo: Evanízia, S. Valdomiro, Yrandir, Emanuele, Dr. Inácio, Valéria, Rose, Karine, Vera, Marly, Sebastião, Xisto, Isabelita, Angélica, Betinha e a Dra. Telma Pinheiro, que prontamente permitiu minha estada e livre acesso no laboratório.

A Alan, que me ensinou o que eu não sabia dos reagentes.

Aos meninos da Equipe de Geohelmintos; Raquel, Anderson, Isis e Carla, que junto a Cícera foram grandes guerreiros nesta pesquisa.

A Wendell e Rafael, pelo esforço para as coisas darem certo.

Aos meus colegas do Departamento, em particular, Gracinha, Ana Claire e Francisco, que se alegraram e me apoiaram até o final deste curso.

À Profª Gisélia Alves, a mãe da idéia, pelas suas sugestões imensamente proveitosas. Você é um tesouro para nossa Pediatria.

À Célia, pela disponibilidade e colaboração, sempre com uma especial delicadeza.

À Profª. Laura Rodrigues, pela sua importante contribuição na metodologia.

À Universidade Federal de Alagoas, na pessoa de sua reitora, Profª Ana Dayse R. Dória, pela confiança e apoio para minha liberação.

À Morena, a colega estrangeira, que sempre foi tão amiga.

À minha Igreja, Primeira Igreja Batista de Maceió, na pessoa do meu Pastor, Tércio Ribeiro de Souza, pelo amor e estímulo em todo tempo. Em especial a Edmilson, Sândi, Aurenize e Pris por assumirem minhas ocupações.

A Walter e Jupira pela assistência e convivência tão prazerosa.

Aos diretores das escolas, professores, Mães e Crianças, que se tornavam parceiros a cada dia de coleta.

Aos meus irmãos; Ubiratan, Iapunira, Iara, Ubiracy e Ubirajara pelo apoio junto às suas famílias.

Resumo

A amebíase é uma infecção causada pela *Entamoeba histolytica* e considerada importante causa de morbi-mortalidade no mundo. O estudo epidemiológico da amebíase tem sido reavaliado desde que a *E. histolytica*, a causadora da forma patogênica, foi distinta da *E. dispar*, causadora da forma não patogênica. A recomendação da Organização Mundial de Saúde é fazer o tratamento apenas nos pacientes com diagnóstico específico da infecção pela *E. histolytica*. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a prevalência da *E. histolytica* em alunos de 4 – 15 anos das escolas públicas da cidade de Maceió, mediante aplicação em série dos testes de microscopia e ensaios imunoenzimáticos: ENZYMEBA® (Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, Havana, Cuba) e *E. histolytica* II® (TechLab Inc., Blacksburg, Estados Unidos). O ENZYMEBA® confirmou todos os resultados positivos para *E. histolytica*/*E. dispar* detectado pela microscopia seguido pela aplicação do teste *E. histolytica* II® que detectou a presença de *E. histolytica*. Um total de 1.798 amostras fecais foi analisado de alunos de 18 escolas públicas. A prevalência da infecção para *E. histolytica*/*E. dispar* pela microscopia e confirmado pelo teste ENZYMEBA® foi de 3,8% e de *E. histolytica* foi de 1,0% pelo *E. histolytica* II®. A aplicação dos dois testes de ELISA permitiu definir a prevalência de 2,8% para *E. dispar*. Considerando o teste *E. histolytica* II® como padrão de referência, o baixo valor preditivo positivo da microscopia de 26,4% refletiu o grande número de resultados falso-positivos para amebíase por este método. Todas as amostras fecais foram submetidas ao exame microscópico, indicando que 38,6% dos alunos estavam parasitados por um ou mais parasitos intestinais. Os parasitos mais freqüentes foram *Ascaris lumbricoides* (16,2%) e *Trichuris trichiura* (11,7%). Os resultados deste trabalho demonstraram que o exame da microscopia óptica não foi o método adequado para o diagnóstico da amebíase e sugere a aplicação de métodos mais sensíveis para o diagnóstico desta parasitose, utilizando técnicas específicas que distingam a *E. histolytica* da *E. dispar*.

Palavras - chaves: Parasitologia – Amebíase; *Entamoeba histolytica* – prevalência e diagnóstico; *Entamoeba díspar* – prevalência; Enteroparasitoses.

Abstract

Amebiasis is an *Entamoeba histolytica* infection and is an important cause of mortality and morbidity in the world. The epidemiologic study of amebiasis have been reviewed since the division between *E. histolytica*, the pathogenic specie and *E. dispar*, the apathogenic. Besides the World Health Organization recommends medication treatment only in patients with the specific diagnosis of *E. histolytica* infection. The aim of this research was to estimate by optical microscopic exam and ELISA tests – ENZYMEBA® by Tropical Medicine Intitute Pedro Kouri,Havana, Cuba and *E. histolytica* II® by TechLab Inc., Blacksburg, Estados Unidos – the prevalence of *E. histolytica* in school children 4 – 15 years in public schools in the city of Maceió. ENZYMEBA® confirmed the presence of *E. histolytica*/*E. dispar* detected by optical microscopic and *E. histolytica* II test® identified the occurrence of *E. histolytica*. 1798 children samples of 18 public schools were analyzed. The infection prevalence for *E. histolytica*/*E. dispar* which was tested by microscopic and confirmed by ENZYMEBA® was 3,8%. There was an occurrence of *E. histolytica* of 1,0% identified by *E. histolytica* II test®. The application of two tests of ELISA permitted to characterize a prevalence of 2,5% for *E. dispar*. Provided that *E. histolytica* II ® was the golden standard test, the low positive predictive value of 26,4% in optical microscopic revealed of the vast amount of false-positives in the survey. All samples were analyzed by optical microscopic examination which detected 38,6% of school children were infected by one or more parasites and 3,8% of them by *E. histolytica*/*E. dispar*. *Ascaris lumbricoides* (16,2%) and *Trichuris trichiura* (11,7%) were the most frequent parasites. The results demonstrated that optical microscopic exam is not proper to diagnose amebiasis. It is suggested the implementation of more sensitive methods for amebiasis analysis with specific technique capable to distinguish *E. histolytica* and *E. dispar*.

Key-Words: parasitology – amoebiasis; *Entamoeba histolytica* – prevalence and diagnostic; *Entamoeba díspar* – prevalence; Enteroparasites.

Lista de Ilustrações

Figura 3.1. Cisto de <i>Entamoeba histolytica</i>	21
Figura 3.2. Prevalência da amebíase no mundo	22
Figura 4.1. Fluxograma da amostra dos alunos por tamanho de escola	37
Quadro 4.1. Quadro da categorização das variáveis	38
Figura 5.1. Fluxograma dos exames de diagnóstico	48
Figura 5.2. Resultado do teste ELISA	49
Figura 5.3. Mapa de Maceió localizando os bairros sorteados e os casos de amebíase	50
Gráfico 5.1: Distribuição dos alunos de escola da rede pública do Município de Maceió, segundo tipo de parasito	54

Lista de Tabelas

Tabela 5.1. Distribuição dos alunos de escola da rede pública do Município de Maceió, segundo sexo e idade	47
Tabela 5.2. Prevalência da infecção pela <i>E. histolytica</i> segundo a idade dos alunos das escolas públicas da cidade de Maceió, Alagoas.....	52
Tabela 5.3. Comparação entre os grupos de perdas e análise segundo sexo e idade de alunos das escolas públicas da cidade de Maceió, Alagoas.....	53

Sumário

RESUMO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GERAL	18
2.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	18
3. <i>Entamoeba histolytica</i>	19
3.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	20
3.2. RECONHECIMENTO DA <i>E. dispar</i> : Aspectos Históricos	22
3.3. PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA	24
3.4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	25
3.4.1. <i>Microscopia</i>	26
3.4.2. <i>Métodos Bioquímicos: Cultura e Isoenzimas</i>	27
3.4.3. <i>Detecção de Anticorpos no soro</i>	28
3.4.4. <i>Detecção de Antígeno nas fezes</i>	30
3.4.5. <i>Detecção de antígeno e anticorpo em outros elementos</i>	32
3.4.6. <i>Reação em cadeia de polimerase (PCR)</i>	32
3.4.7. <i>Outros exames</i>	32
4. MÉTODOS	34
4.1. TIPO E DESENHO DE ESTUDO	35
4.2. LOCAL E PERÍODO DA PESQUISA	35
4.3. PÚBLICO ALVO	35
4.4. POPULAÇÃO DE ESTUDO	35
4.5. TIPO DE AMOSTRAGEM	35
4.5.1. <i>Seleção dos Alunos</i>	36
4.5.2. <i>Perdas</i>	37
4.5.3. <i>Definição do tamanho da amostra</i>	37
4.6. DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS	38
4.6.1. <i>Categorização das variáveis</i>	38
4.6.2. <i>Definição de caso</i>	39
4.7. OPERACIONALIZAÇÃO	39
4.7.1. <i>Aplicação do Questionário</i>	39
4.7.2. <i>Coleta das Amostras de fezes e análise parasitológica</i>	39

4.7.3. Aplicação dos Testes de ELISA	40
4.8. PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS	41
4.8.1. Microscopia: Método de Ritchie	41
4.8.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	42
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4.10. ASPECTOS ÉTICOS	45
4.10.1. Tratamento Antiparasitário	45
4.10.2. Termo de Consentimento Livre e Informando	45
5. RESULTADOS	46
5.1. CARACTERIZAÇÃO GERAL DA AMOSTRA	47
5.1.1. Condições ambientais e Referência de viagem	47
5.2. PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PELA <i>E. histolytica</i>	48
5.2.1. Localização Geográfica	49
5.2.2. Valor Preditivo	50
5.2.3. Prevalência da infecção pela <i>E. histolytica</i> em relação à idade dos alunos	51
5.2.4. Prevalência da infecção pela <i>E. histolytica</i> em relação ao sexo dos alunos	52
5.2.5. Condições ambientais e Referência de viagem	53
5.2.6. Análise das perdas	53
5.3. PREVALÊNCIA DAS PARASITOSEs	54
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	68
APÊNDICE	76
ANEXO	79



1 Introdução



A amebíase é uma infecção determinada pela *Entamoeba histolytica* (Schaudinn 1903), prevalente em todo o mundo e comum nos países em desenvolvimento. É responsável pela morte de 100.000 pessoas por ano, sendo a segunda causa de morte por protozoário, após a malária (GONIN e TRUDEL, 2003; WALSH, 1988; WHO 1997b).

A observação microscópica para pesquisa de cistos/trofozoítos nas fezes é ainda o exame de escolha para o diagnóstico da amebíase intestinal. No entanto, este procedimento tem sido reavaliado desde que foi demonstrado que existem espécies distintas de *Entamoeba*, que apesar de possuírem as mesmas características morfológicas, são diferentes com relação a sua capacidade de causar doença (CLARK e DIAMOND, 1993). Considera-se atualmente a existência de duas espécies sendo a *E. histolytica* invasiva e patogênica, e a *Entamoeba dispar* (Brumpt 1925), não invasiva e não patogênica. Esta reclassificação foi resultado de dados clínicos, bioquímicos, imunológicos e genéticos, e representaram um avanço significativo no conhecimento sobre a amebíase (HUSTON e PETRI, 1999).

Como a infecção com a *E. dispar* é aproximadamente 10 vezes mais comum que a infecção com a *E. histolytica* e não podem ter distinção visualmente, o uso da microscopia para o diagnóstico da amebíase resulta em dados superestimados e tratamentos desnecessários. Além do que a microscopia tem uma sensibilidade de apenas 60% comparada com a cultura e análise isoenzimática. Diante da incapacidade da microscopia de distinguir entre as duas espécies (*E. histolytica* e *E. dispar*), a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que o resultado do exame parasitológico de fezes realizado pela microscopia deve ser registrado como *E. histolytica/E. dispar* (HAQUE et al., 1995; HUSTON e PETRI, 1999a; WHO,1997a).

De acordo com o estabelecido pela OMS (WHO,1997b), devem ser adotados procedimentos que permitam a diferenciação entre as duas espécies, uma vez que o tratamento da amebíase deverá ser administrado somente nos casos em que *E. histolytica* for confirmada. As duas espécies podem ser

diferenciadas por métodos bioquímicos, imunológicos e de biologia molecular. Entre estes, os testes de detecção do antígeno têm sido aplicados em várias pesquisas mediante sua rapidez, precisão e viabilidade, sendo um instrumento para medir a prevalência da infecção pela *E. histolytica* (DOGANCI et al., 2004; HAQUE et al., 1999; NESBITT et al., 2004).

Clinicamente a *E. histolytica* e não a *E. dispar* é a responsável pela presença de colite ou abscesso hepático. Não foram encontrados casos documentados de doença intestinal causada pela *E. dispar*. Apenas a *E. histolytica* pode causar doença intestinal e extraintestinal. (HAQUE et al., 1999; TANYUKSEL e PETRI, 2003).

Os estudos publicados com a distinção entre as espécies de *Entamoeba* revelam que a prevalência da infecção é muito diferente de acordo com o lugar (HAQUE et al., 2003). Em Bangladesh em estudo com pré-escolares foi observada prevalência de 5% para *E. histolytica* e 13% para *E. dispar*; na Tanzânia, avaliando 842 indivíduos foi observado que 1% estava infectado pela *E. histolytica* e 15% pela *E. dispar*; no Canadá foi verificada prevalência de 1,0% para *E. histolytica* e 7,3% para *E. dispar* (EVANGELOPOULOS et al., 2001; HAQUE et al., 1999; NESBITT et al., 2004).

No Brasil em particular, existem diferenças quanto a frequência da parasitose de acordo com a cidade pesquisada. Os índices mais elevados da infecção foram observados em Belém, no Pará, com cerca de 29% de indivíduos diagnosticados albergando *E. histolytica* (PÓVOA et al., 2000; SILVA et al., 2005). Em Fortaleza, no Ceará, Braga et al. (2001a) encontraram prevalência de 14,9% , enquanto em Pernambuco nenhum caso de infecção devido a *E. histolytica* foi ainda registrado (ACA et al., 1994; PINHEIRO et al., 2004).

Em Alagoas, os dados sobre amebíase estão inclusos nos estudos sobre enteroparasitoses, utilizando a microscopia como método de diagnóstico. Este estudo se propõe a estimar a prevalência da amebíase em escolares da rede pública da cidade de Maceió, com a utilização de métodos específicos para o diagnóstico da infecção pela *E. histolytica*.

Diante da carência no Brasil de estudos que confirmem o diagnóstico específico da amebíase, esta pesquisa virá contribuir de forma efetiva para a epidemiologia desta infecção em nosso país.



2 Objetivos



2. 1. OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência da *E. histolytica* de alunos matriculados nas escolas públicas da cidade de Maceió

2.2. OBJETIVO SECUNDÁRIO

Estimar a prevalência das enteroparasitoses de alunos matriculados nas escolas públicas da cidade de Maceió.



3 *Entamoeba histolytica*: Revisão da Literatura



3.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A *E. histolytica* (Figura 3.1) é o agente etiológico da amebíase, importante problema de saúde pública, responsável por um grande número de doentes e mortes por colite e abscesso hepático em várias partes do mundo, principalmente nos países pobres. A *E. dispar* é uma ameba morfológicamente igual à *E. histolytica* que também coloniza o intestino grosso, mas sem poder invasivo (ESPINOSA-CANTELLANO e MARTÍNEZ-PALOMO, 2000; TROLL et al., 1997).

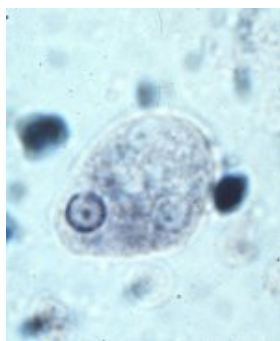


Figura 3.1. Cisto de *Entamoeba histolytica*

A amebíase é atualmente a segunda causa de mortalidade no mundo causada por protozoário, após a malária, estimando-se que afete aproximadamente 34-50 milhões de indivíduos e seja responsável por 100.000 mortes anualmente (DOGANCI et al., 2004; GONIN e TRUDEL, 2003; PETRI e SINGH, 1999; TANYUKSEL e PETRI, 2003; WHO, 1997a). Entretanto o diagnóstico da amebíase tem sido tradicionalmente feito pela aplicação da coproscopia, que é incapaz de diferenciar a *E. histolytica* da *E. dispar*. A distinção entre as duas espécies vem sendo alvo de vários estudos, desde que Sargeant et al. (1978) demonstraram que a *Entamoeba* patogênica e não patogênica poderiam ser distinguidas individualmente usando a eletroforese isoenzimática (HUSTON e PETRI, 1999a; WALSH et al., 1988). Estimar a verdadeira prevalência

da amebíase não tem sido fácil, porque a maioria das pesquisas foi baseada no resultado da coproscopia, limitando o entendimento da magnitude e epidemiologia desta infecção (PETRI et al., 2000; TANYUKSEL e PETRI, 2003; WALSH, 1986). Isso implica considerar que os dados mais recentes da distribuição da *E. histolytica* no mundo são bem mais reduzidos (BLESSMANN et al., 2002).

As manifestações clínicas da amebíase podem se apresentar de formas muito diversas. A maioria dos infectados não apresenta sintomas, e só uma pequena percentagem sofre de febre, disenteria ou abscesso hepático. O acometimento extra-intestinal atinge com mais frequência o fígado, causando a hepatite amebiana ou o abscesso de fígado; pode se estender para outros órgãos, como cérebro, pulmão e aparelho geniturinário, embora seja muito raro. (ACKERS, 2002, WALSH, 1988). São considerados vários grupos de risco para amebíase grave, como crianças, idosos, desnutridos, gestantes e pacientes em uso de corticóides (HUSTON e PETRI, 1999a).

A amebíase é uma parasitose que atinge várias partes do mundo (Figura 3.2). Exceto na Colômbia e no México, a doença invasiva não parece ser muito comum nas Américas Central e do Sul. Os dados de prevalência da África, da Ásia e subcontinente indiano evidenciam altas taxas de morbidade e mortalidade pela amebíase. Entretanto, a amebíase não é uma doença exclusiva do mundo em desenvolvimento. Nos países industrializados da Europa e América do Norte, a amebíase afeta principalmente grupos definidos da população como: homens homossexuais, turistas que viajam para áreas endêmicas, doentes mentais institucionalizados e imunodeprimidos HIV positivos (HUSTON e PETRI., 1999a; WALSH, 1986).

No Brasil, os estudos sobre prevalência da amebíase nas populações testadas, apresentaram grande diversidade, variando de acordo com a região. Em Belém, no Pará, foi estimada a prevalência de 29% (PÓVOA et al., 2000); em Fortaleza, no Ceará, foram encontradas prevalências de 10,6% a 14,9% (BRAGA et al., 1998, 2001a) e em Manaus, no Amazonas, 6,8% (SILVA et al., 2005). Em Pernambuco, nenhum caso de infecção devido a *E. histolytica* foi registrado (ACA et al., 1994; NOZAKI et al., 1990; PINHEIRO et al., 2004).

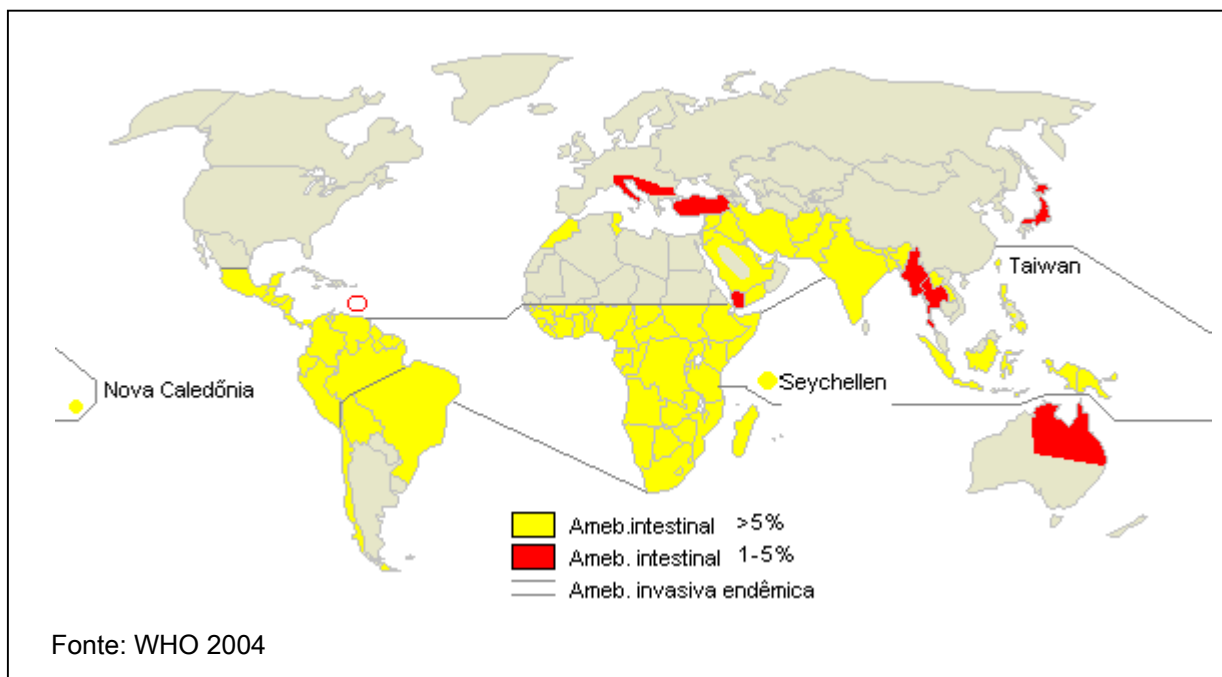


Figura 3.2. Prevalência da amebíase no mundo

3.2. RECONHECIMENTO DA *Entamoeba dispar* : ASPECTOS HISTÓRICOS

Em 1875, Fedor Aleksandrovich Lösch estudou microscopicamente as fezes de um camponês de Saint Petersburg na Rússia, que sofria de disenteria crônica. Ele observou grande número de microorganismos nas fezes do paciente, que denominou de *Ameba coli* e demonstrou que produziam ulcerações e disenteria em cachorros. O paciente de Saint Petersburg foi o primeiro registro de morte por amebíase, com a demonstração em sua necropsia de numerosas e extensas ulcerações na mucosa do cólon. Em 1903, Schaudinn renomeou o microorganismo de Lösch de *Entamoeba histolytica* (ACKERS, 2002; GALINDO, 2000).

Em 1925, Emile Brumpt sugeriu a existência da *E. histolytica* como um complexo de duas espécies: a *Entamoeba disenteriae*, que causava a infecção sintomática e a *Entamoeba dispar* encontrada nos pacientes assintomáticos

(BONILLA, 2001; GALINDO, 2000). Por muitos anos não se esclareceu se a morbidade devido à infecção era consequência das diferenças do hospedeiro ou do parasito.

O primeiro resultado bioquímico sugerindo que Brumpt estava correto foi em 1973 quando Martinez-Palomo demonstrou diferenças na aglutinação das amebas patogênica e não patogênica (ACKERS, 2002; HUSTON e PETRI, 1999a). Depois, em 1978, Sargeant et al. empregaram e analisaram o padrão eletroforético das isoenzimas da hexoquinase do parasito, procedentes de indivíduos com e sem manifestações clínicas, confirmando a existência de duas espécies de ameba, uma vez que dois zimodemas distintos foram observados, o que permitiu separar a espécie patogênica da apatogênica. A partir daí se concluiu que a ameba classicamente conhecida como *E. histolytica* na realidade compreende duas espécies morfológicamente idênticas: a *E. histolytica*, responsável pela doença, e a *E. dispar* um comensal do intestino grosso que não causa doença (BONILLA, 2001; SARGEANT et al., 1978; TANYUKSEL e PETRI, 2003).

Os estudos evoluíram e diferenças bioquímicas, imunológicas e genéticas entre as duas espécies foram observadas. Tannich et al. (1989), demonstraram através da análise do DNA genômico que a *E. histolytica* patogênica e a não patogênica representavam duas formas distintas geneticamente. Em 1993, Clark e Diamond confirmaram a existência das duas espécies morfológicas idênticas proposto por Brumpt e sugeriram o nome de *E. dispar* para a espécie não patogênica. Finalmente, a OMS (WHO,1997a), em conferência na cidade do México, formalizou esta nova definição e recomendou vários critérios para a separação entre as duas espécies, tais como:

- O critério de tamanho usado para a descrição taxonômica clássica da *E. histolytica* não serve para distinguir entre a *E. histolytica* e *E. dispar* e no diagnóstico pela microscopia os cistos das duas espécies são idênticos.
- Quando o diagnóstico for feito pela microscopia óptica, desde que os cistos das duas espécies são indistinguíveis, deve ser registrado como *E. histolytica/E. dispar*.

- Nos indivíduos assintomáticos o tratamento não é apropriado quando a *E. histolytica*/*E. dispar* for identificada.
- A maneira correta é a identificação específica da *E. histolytica* e, se presente, tratada.

3.3. *Entamoeba histolytica*: PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA

A infecção amebiana tem início quando cistos maduros de *E. histolytica* são ingeridos e se multiplicam no intestino grosso de indivíduos suscetíveis. A *E. histolytica* pode invadir a barreira do epitélio intestinal e causar manifestações clínicas intestinais e extra-intestinais. Em experiências com animais, foi demonstrado que a *E. dispar* não produz lesões invasivas na mucosa do intestino (CLARK e DIAMOND, 1994; MARTINEZ-PALOMO e ESPINOSA-CANTELLANO, 1998; ZAKI et al., 2002).

Vários fatores do hospedeiro e do parasito influenciam o processo de invasão e desenvolvimento da doença amebiana. A *E. histolytica* é um patógeno com vários graus de virulência, ou seja, é capaz de produzir doença, todavia com apresentação clínica bastante diversificada. No que tange à *E. dispar*, demonstrou-se que ela é apatogênica (CLARCK e DIAMOND, 1994; WALSH, 1986). Foram identificadas proteínas associadas com a virulência da *E. histolytica*, entre elas a lectina inibitória da aderência de galactose e N-acetil-D-galactosamina (Gal-GalNac) da *E. histolytica* é uma proteína de superfície que media a aderência do parasito à mucosa do cólon, células epiteliais e outras célula alvo; os amebaporos, peptídeos que lesam as células do hospedeiro e as proteases, que degradam os tecidos do hospedeiro (ESPINOSA-CANTELLANO e MARTINEZ-PALOMO, 2000; GALINDO, 2000; GILCHRIST e PETRI, 1999; PETRI e SINGH, 1999).

3.3.1. Fatores de risco para amebíase

Os estudos epidemiológicos demonstram que a infecção pela *E. histolytica* é endêmica nos países subdesenvolvidos de clima temperado e tropical e que o baixo nível socioeconômico e condições higiênico-sanitárias inadequadas são fatores de risco para instalação da infecção (TANYUKSEL e PETRI, 2003). A avaliação dos indicadores ambientais, demográficos, socioeconômicos e de saúde é de fundamental importância no estudo da amebíase na criança e possibilita determinar a prevalência de diversos problemas de saúde, identificando os possíveis fatores de risco para a morbidade infantil, e em particular, para infecção pela *E. histolytica*.

Os indicadores ambientais – de habitação, água e saneamento – não só revelam o local e as condições de moradia, mas são também importantes indicadores sócio-econômicos. A ausência de água tratada para beber foi responsável por múltiplas parasitoses observadas na cidade do México, incluindo a infecção pela *E. histolytica* e *E. dispar* (RAMOS et al., 2005). No Vietnã foi demonstrada uma forte associação da ausência de anticorpos antiamebianos nos indivíduos com acesso a sanitário e à água encanada. Ao contrário, foi observado alto nível de anticorpos nos indivíduos que usavam água de rio (BLESSMANN et al., 2002). Pillai et al. (1999), no Canadá, elegeram como fatores de risco para infecção pela *E. histolytica*: viagem dentro de seis meses, homossexuais masculinos ou imigrantes dos trópicos há menos de dois anos. Uma variável assinalada pelo Ministério da Saúde (2006) é o tipo de parede da casa, como indicador de saúde.

3.4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Historicamente, o exame da microscopia óptica tem sido o método de escolha para o diagnóstico da amebíase. Como a infecção com a *E. dispar* é aproximadamente 10 vezes mais comum que a infecção pela *E. histolytica* e a microscopia não pode distinguir entre as duas espécies, o uso da microscopia resulta em uma superestimativa da infecção e tratamento desnecessário (NOZAKI, 2000; TANYUKSEL et al., 2005)

Um método convencional para diferenciar entre as duas espécies de amebas é a cultura de trofozoítos seguida da determinação do padrão isoenzimático pela eletroforese. Entretanto, na prática, estes exames apresentam várias desvantagens, tais como: a cultura das fezes nem sempre tem sucesso, necessita de sete a quatorze dias para o crescimento dos trofozoítos e sua aplicação é muito difícil (ACKERS, 2002; NOZAKI, 2000; NÚÑEZ et al., 2001). A análise isoenzimática identificou os primeiros marcadores, mas hoje sua aplicação demonstra que muitos zimodemas são incertos e o padrão isoenzimático pode sofrer variações, sendo raramente usado para o diagnóstico da amebíase (ACKERS, 2002; ZAKI e CLARK, 2001).

De acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) a “*E. histolytica* deve ser especificamente identificada e, se presente, tratada; se apenas a *E. dispar* é identificada, o tratamento não é necessário”. Seguindo este critério, muitos métodos têm sido desenvolvidos, incluindo técnicas bioquímicas e moleculares aplicadas para o diagnóstico preciso da *E. histolytica* (ACKERS, 2002; WHO, 1997a).

3.4.1. Microscopia Óptica de Amostra de Fezes

A OMS concluiu que quando a microscopia demonstrasse trofozoítos com ingestão de eritrócitos em fezes frescas ou em tecido de biópsia, havia forte correlação com a presença de *E. histolytica* e doença invasiva (WHO, 1997b). No entanto, para isto ser possível as amostras tinham que ser examinadas dentro de 30 minutos e serem logo fixadas (ACKERS, 2002).

González-Ruiz et al. (1994), comparando a microscopia com a análise do zimodema como padrão ouro, demonstrou que a observação de ameba eritrofagocitária era 100% específica e preditiva da infecção invasiva de *E. histolytica*. Em outros estudos, porém, observou-se trofozoítos de outras espécies de ameba não patogênicas contendo eritrócitos, com falso diagnóstico de *E. histolytica*. Na Etiópia, local de grande prevalência da amebíase, foram coletadas 108 amostras de pacientes com diagnóstico de disenteria amebiana apresentando

trofozoítos hematófagos nas fezes, diagnosticados pela microscopia como infecção pela *E. histolytica*. Comparando a microscopia com a PCR como padrão de referência, apenas um caso foi diagnosticado como *E. histolytica* pela PCR, e 30 amostras foram negativas para *E. histolytica* e *E. dispar*. Provavelmente seriam trofozoítos de outras amebas intestinais não patogênicas ou macrófagos fecais diagnosticados como *E. histolytica* pela microscopia (KEBEDE et al., 2004). Além do que em alguns casos a *E. dispar* pode também ingerir eritrócitos (HAQUE et al., 1995; TANYUKSEL et al., 2005).

Entre muitos fatores que afetam o resultado da microscopia, pode-se mencionar: falta de microscopistas bem treinados; condições inadequadas de coleta; interferência de substâncias como antibióticos (tetraciclina ou sulfonamidas), laxativos, antiácidos ou antidiarréicos; excreção intermitente de cistos; dificuldade de diferenciar a *E. histolytica* da *E. dispar* e da *E. moshkovskii* (ACKERS, 2002; TANYUKSEL e PETRI, 2003; WALSH, 1986).

A grande desvantagem da microscopia está na sua baixa sensibilidade, estimada entre 40 e 60% (VERWEIG et al., 2003). Comparando a microscopia com a cultura, Haque et al. (1997) encontraram uma sensibilidade de 35% e uma especificidade de 99% em estudo realizado na cidade de Bangladesh. Na Tanzânia, em uma amostra de 842 indivíduos, comparando o resultado da microscopia com o teste de ELISA, foram observados resultados semelhantes com uma sensibilidade de 39% e especificidade de 96% (NESBITT et al., 2004). Portanto, desde que a microscopia não apresenta boa sensibilidade para o diagnóstico da amebíase, torna-se necessária a aplicação de outros exames para tornar o diagnóstico mais seguro e confiável (DOGANCI et al., 2004; PETRI, 2001; TANYUKSEL et al., 2005).

3.4.2. Métodos Bioquímicos: Cultura e Isoenzimas

O meio de cultivo mais utilizado para cultura xênica da *E. histolytica* tem sido o meio de Robinson e TYSGM-9 de Diamond (TANYUKSEL e PETRI, 2003). A cultura apresenta maior sensibilidade que a microscopia e seguida da análise

isoenzimática é capaz de diferenciar a *E. histolytica* da *E. dispar* (HAQUE et al., 1998). Porém, a detecção pela cultura da *E. histolytica* não é um indicador se ela é invasiva ou não.

Um total de 22 diferentes zimodemas foi classificado pela eletroforese das isoenzimas, sendo apenas nove determinantes da doença invasiva (ACA et al., 1993; TANYUKSEL e PETRI, 2003). Alguns estudos sugerem que a qualidade dos resultados deste exame depende das condições da cultura utilizada (TACHIBANA et al., 1992). A análise do perfil isoenzimático dos zimodemas é capaz de fazer a distinção entre os zimodemas patogênicos e não patogênicos (GONZÁLEZ-RUIZ et al., 1994). Classicamente, para distinguir as formas patogênicas e não patogênicas da ameba, o padrão isoenzimático obtido a partir dos parasitos provenientes da cultura de ameba tem sido utilizado como padrão ouro em várias pesquisas (ACKERS, 2002; BLESSMANN, et al., 2002; HUSTON et al., 1999b).

Entretanto, as culturas de ameba e análise isoenzimática requerem de uma a duas semanas para serem concluídas e seus resultados muitas vezes não são satisfatórios e não são úteis na prática da rotina laboratorial (HAQUE et al., 1998; TANYUKSEL e PETRI, 2003). Existe risco de uma espécie crescer superando a outra em culturas de infecção mista, como a associação entre *E. histolytica*/*E. dispar* com *E. coli* (HAQUE et al., 1998; RIVERA et al., 1998) e a manutenção do protozoário na cultura requer trabalho intenso e complexo para o laboratório (EVANGELOPOULOS et al., 2001). Mesmo no Japão, onde se desenvolve grande número de pesquisas avançadas em amebíase, o método de cultivo com a eletroforese isoenzimática são realizados em poucos laboratórios (NOZAKI, 2000). Diante destes inconvenientes poderia se concluir que a cultura de *Entamoeba* e a eletroforese isoenzimática são, sobretudo instrumentos de pesquisa, mas não são práticos para o uso do diagnóstico clínico (NOZAKI, 2000; PETRI e SINGH, 1999; TANYUKSEL e PETRI, 2003).

3.4.3. Detecção de Anticorpos no soro

Este exame é um instrumento útil para o diagnóstico do abscesso de fígado amebiano, no qual a maioria dos pacientes não apresenta parasitos nas fezes e a detecção de anticorpos para ameba tem grande importância. Os anticorpos IgM antilectina Gal-GalNac se apresentam durante a primeira semana e a IgG antilectina Gal-GalNac pode se apresentar após uma semana do início dos sintomas nos pacientes com abscesso hepático amebiano e colite amebiana. A pesquisa de anticorpos possui uma sensibilidade para o abscesso hepático amebiano de 90% e para colite amebiana de 70%. Esta diferença ocorre diante do grande aumento de anticorpos na amebíase invasiva extra-intestinal ao contrário dos níveis de anticorpos existente nas formas não invasivas (PETRI e SINGH, 1999; SÁNCHEZ-GUILLÉN et al., 2002). A desvantagem deste teste é que detecta os anticorpos contra todos os antígenos da ameba e os pacientes continuam positivos por muitos anos após a infecção ou até mesmo após a cura. Enquanto a detecção da infecção pela *E. histolytica* nas fezes é útil para determinar a prevalência em um ponto, os testes sorológicos para anticorpos antiamebianos podem ser usados para avaliar a experiência acumulativa da população com a infecção pela *E. histolytica* (BLESSMANN et al., 2002; HAQUE et al., 1999, 2000;).

Os exames realizados incluem hemaglutinação indireta (IHA), contra-imunoeletroforese (CIE), teste de imunodifusão em gel de ágar, fixação de complemento (CF), aglutinação do látex, imunofluorescência indireta (IFI) e Ensaio imunoenzimático (ELISA). O teste de ELISA é um dos métodos mais utilizados em todo mundo. Os testes sorológicos pelo ELISA são aplicados para demonstrar a presença de anticorpos anti-amebianos no soro e são mais recomendados em pacientes com suspeita de abscesso hepático e indivíduos assintomáticos infectados pela *E. histolytica* (TANYUKSEL e PETRI, 2003). A IHA é de grande utilidade no diagnóstico da amebíase invasiva, em particular nos pacientes infectados pelo HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana/ Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) pelo declínio das células T. Apesar da IHA ser uma técnica sem dificuldade, sua baixa sensibilidade pode levar a resultados falso-negativos, quando comparado ao ELISA, nos pacientes positivos para o HIV (TANYUKSEL e PETRI, 2003).

3.4.4. Detecção de Antígeno nas fezes

Estes testes específicos baseados no ELISA utilizam anticorpos monoclonais contra a lectina Gal/GalNac contra o antígeno *rico em serina* da *E. histolytica* (TANYUKSEL e PETRI, 2003).

Muitos investigadores têm desenvolvido métodos que detectam antígenos da *E. histolytica* nas amostras de fezes frescas com sensibilidade próxima ou igual à cultura (HAQUE et al., 1995; HUSTON e PETRI, 1999a). Vários conjuntos de exames ELISA são comercializados como *TechLab*[®], *The Alexon ProSpectT*[®], *Triage*[®] e *Remel*[®] nos Estados Unidos; *Cellabs*[®], na Austrália; *Merlin Optimum S*[®]; *R-Biopharm*[®], na Alemanha; *ENZYMEBA*[®] em Cuba (ACKERS, 2002; GALINDO et al., 1998a; PILLAI et al., 1999; TANYUKSEL e PETRI, 2003).

3.4.4.1. Testes *Entamoeba*[®] e *E. histolytica II*[®] (*TechLab Inc.*, Blacksburg, Estados Unidos)

Alguns gens específicos para *E. histolytica* e ausentes na *E. dispar* têm sido identificados e quase todos codificam proteínas homólogas, que resultam em epitopos específicos da espécie. A detecção destes epitopos com anticorpos monoclonais é base de vários métodos diagnósticos. De seis anticorpos estudados contra a lectina Gal/GalNac, apenas dois reagem com o complexo *E. histolytica* e *E. dispar*, enquanto que os outros quatro reagem apenas com a *E. histolytica*. Estes anticorpos são a base de dois conjuntos fabricados pela *TechLab*: o teste *Entamoeba*[®], que aplica um dos anticorpos monoclonais não específicos, identificando o complexo *E. histolytica/E. dispar* e o *E. histolytica II*[®], baseado em um anticorpo monoclonal específico para identificar a *E. histolytica* (ACKERS, 2002).

O teste de detecção de antígeno do teste *E. histolytica II*[®] tem a capacidade de distinguir a *E. histolytica* da *E. dispar* (HAQUE et al., 1995, 1997, 1998; HUSTON e PETRI, 1999a; PETRI e SINGH, 1999). Vários pesquisadores têm

desenvolvido o método de ELISA que detecta antígenos de ameba em fezes frescas, demonstrando sensibilidade e especificidade maior que 85%, quando comparado à cultura, considerado padrão ouro em vários trabalhos (HAQUE et al., 1998; 2000; TROLL et al., 1997). Haque et al. (1998) testaram a técnica de PCR para detecção da *E. histolytica* e compararam com a análise isoenzimática e o teste de detecção de antígeno *E. histolytica* específico da *TechLab*. Todos os três testes apresentaram excelente confiabilidade, entretanto, entre as três técnicas, o teste de detecção de antígeno da *TechLab* foi o mais rápido e simples.

Postas estas considerações, fica fácil entender a vantagem deste método sobre todos os outros utilizados atualmente para o diagnóstico da amebíase, que além de ser muito conveniente, não requerer nenhum equipamento sofisticado, nem pessoal com treinamento especial, apresenta resultados validados com boa sensibilidade e especificidade (HAQUE et al., 1998; HUSTON et al., 1999b; EVANGELOPOULOS et al., 2001; TANYUKSEL e PETRI, 2003).

3.4.4.2. *ENZYMEBA*® (Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, Havana, Cuba).

O *ENZYMEBA*® é um teste de ELISA baseado na captura da histolisina das cepas de *E. histolytica* e *E. dispar* (LUACES e BARRET, 1998). É designado para detectar, mas não diferenciar a *E. histolytica* da *E. dispar*. Tem a vantagem de usar amostras de fezes congeladas e determinar com maior precisão o resultado da microscopia (GALINDO, 2000). Foi desenvolvido por Luaces et al. (1992) e validado por Fonte et al. (1998). Desde que o exame microscópico apresenta dificuldade de diferenciar a *E. histolytica/E. dispar* da *E. moshkovskii*, o teste seria útil para confirmar com maior precisão apenas o complexo *E. histolytica/E. dispar*, reduzindo o risco de falsos positivos no diagnóstico da amebíase intestinal (PETRI e SINGH, 1999). O *ENZYMEBA*® mediante uma só amostra de fezes por indivíduo, apresenta sensibilidade de 100% e especificidade de 99,1%, quando comparado com o resultado de três exames microscópicos (GALINDO et al., 1998a).

3.4.5. Detecção de antígenos e anticorpos em outros materiais biológicos

Os antígenos da ameba têm sido também detectados na saliva e na secreção do abscesso hepático dos pacientes infectados. Foi detectada lectina Gal/GalNac no soro de pacientes com abscesso hepático utilizando o conjunto de exames da TechLab *E. histolytica* II (TANYUKSEL e PETRI, 2003).

Os anticorpos IgG na saliva têm sido pesquisados em várias infecções por *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma mansoni*, *Helicobacter pylori* e hepatite A (ABD-ALLA et al., 2000). No México, a detecção de anticorpos anti-LC3 IgG na saliva pelo ELISA foi um meio efetivo para o diagnóstico do abscesso hepático e colite pela ameba (RAMOS et al., 2005).

3.4.6. Reação em cadeia de polimerase (PCR)

A PCR é um método específico para amplificação do DNA genômico da *E. histolytica* e *E. dispar*. Uma das grandes vantagens deste método é a identificação das espécies de *Entamoeba* como também das cepas de *E. histolytica*. Métodos de extração têm sido desenvolvidos, com sensibilidade de 94% e especificidade de 100% (TANYUKSEL e PETRI, 2003).

A extração de DNA das fezes e os iniciadores específicos têm sido a chave do sucesso para o diagnóstico pela PCR. Vários métodos são publicados e conjuntos comerciais estão disponíveis, como o *Qiagen*[®] produzido pelo laboratório *Hilden* (Alemanha), que extrai o DNA de amostras de fezes fixadas em formalina. Entretanto a sua aplicação é complexa, exige equipamento sofisticado e técnicos experientes. Portanto é uma técnica que apresenta uma certa dificuldade de ser aplicada nos países em desenvolvimento (HUSTON e PETRI, 1999a; TANYUKSEL e PETRI, 2003).

3.4.7. Outros exames para o diagnóstico da amebíase

A retossigmoidoscopia é um importante método para diagnosticar a colite

amebiana porque a doença pode ser localizada no ceco ou cólon ascendente, permitindo a visualização das ulcerações e retirada de material para biópsia. Os estudos de imagem como tomografias, ultra-sonografias e ressonância magnética constituem métodos sensíveis no diagnóstico dos abscessos amebianos, porém é incapaz de diferenciar um abscesso piogênico do amebiano. A punção do abscesso hepático pode ajudar a esclarecer a etiologia da doença, mas é difícil a detecção dos trofozoítos. A punção hepática só é recomendada nos casos em que não há regressão da doença após tratamento, pois constitui procedimento de alto risco (PETRI e SINGH, 1999; SILVA e GOMES, 2000).

O conhecimento sobre a *E. histolytica* e as técnicas de diagnóstico da amebíase têm aumentado nos últimos anos. A aplicação destes conhecimentos se tornou um grande desafio nas ações públicas de saúde para o combate à morbidade e mortalidade devido à *E. histolytica* no mundo. A OMS (WHO, 1997a) considera que:

- É urgentemente necessário nos países em desenvolvimento o aperfeiçoamento de métodos específicos para o diagnóstico para infecção pela *E. histolytica* usando técnicas apropriadas;
- Não existem dados disponíveis confiáveis sobre a prevalência da *E. histolytica* e a obtenção destes dados deve ser de grande prioridade;
- Dados da prevalência sobre portadores assintomáticos de *E. histolytica*, os quais podem progredir para doença invasiva e a transmissão para novos indivíduos é inadequada. É muito importante a obtenção de mais informações para o planejamento de estratégias para o controle da doença.



4 Métodos



4.1. TIPO E DESENHO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo transversal de prevalência da amebíase em alunos de escolas públicas da cidade de Maceió. Este tipo de estudo foi escolhido pela sua adequação para a proposta de levantamento de freqüência da amebíase numa população definida, dentro de um tempo específico.

4.2. LOCAL E PERÍODO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no período de março de 2004 a maio de 2005, em alunos das escolas públicas da cidade de Maceió – Alagoas.

4.3. PÚBLICO ALVO

O grupo alvo deste estudo foi formado por alunos de escolas públicas da cidade de Maceió, com idade entre 4-15 anos de idade, de ambos os sexos. Em Maceió, segundo dados da Secretaria de Educação do Estado de Alagoas, foram listadas 158 escolas do ensino fundamental, municipais e estaduais, com 86.757 alunos matriculados nesta faixa etária.

4.4. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram incluídos no estudo alunos de 4-15 anos de idade matriculados e freqüentando a escola nos últimos 30 dias, que estudavam no período da manhã, residentes em 14 bairros da cidade de Maceió.

4.5. TIPO DE AMOSTRAGEM

O método de amostragem dos estudantes foi equiprobabilística em múltiplos estágios, cujas etapas são descritas abaixo:

1ª. Estratificação por área administrativa

Foi estabelecida uma estratificação das escolas em três áreas (Núcleo 1, Núcleo 2 e Núcleo 3), de acordo com a divisão utilizada pela secretaria de educação do Estado de Alagoas, representando as áreas geográficas da cidade de Maceió. Nesta etapa foi feita uma partilha proporcional, ou seja, o número de alunos de cada área presente na amostra foi proporcional ao total do número de alunos existente naquela área, na mesma faixa etária.

2ª. Estratificação pelo tamanho da escola

Em cada área foram considerados dois estratos: um correspondente às escolas com menos de 500 alunos e outro correspondente às escolas com mais de 500 alunos, com idade menor que 15 anos. A utilização desta divisão considerou a possibilidade de que os alunos que freqüentassem as escolas maiores poderiam apresentar características diferentes daqueles que freqüentavam as escolas menores.

3ª. Sorteio das escolas em cada estrato

Para cada estrato, escolas menores que 500 alunos e escolas maiores que 500 alunos, foi realizado um sorteio das escolas, com probabilidade proporcional ao número de alunos, na faixa etária até 15 anos. Foram sorteadas três escolas para cada estrato.

4.5.1. Seleção dos alunos

Nas escolas foram selecionadas todas as salas de aula que tinham alunos com idade de 4-15 anos, que estudassem no período da manhã. Participaram da pesquisa todos os alunos que trouxeram as amostras, nos quais os responsáveis tinham assinado o termo de consentimento (Apêndice 1) e responderam ao questionário (Apêndice 2).

4.5.2. Perdas

Foram considerados como perdas todos os alunos que tiveram seu questionário aplicado, mas não trouxeram as amostras de fezes. Como estratégia para minimizar este viés de seleção, os indicadores biológicos e ambientais deste grupo foram analisados e comparados ao grupo de análise, utilizando o teste do *qui-quadrado*.

4.5.3. Definição do Tamanho da Amostra

Para o cálculo do tamanho da amostra foi considerada a frequência esperada de 8%, observada por Dacal e colaboradores (1984) em favelados de Maceió da *E. histolytica*, considerando o pior resultado aceitável de 6,7%, que corresponde a um erro de 15%, com um intervalo de 95% de confiança. O tamanho da amostra foi estimado em 1.670 alunos, divididos proporcionalmente em três núcleos (Figura 4.1).

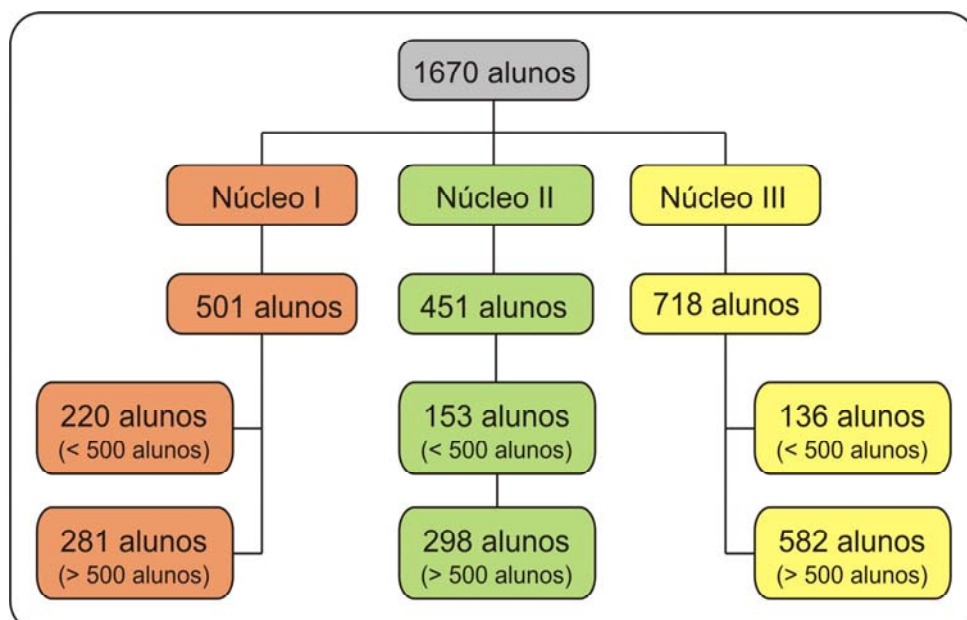


Figura 4.1. Fluxograma da amostra dos alunos por tamanho de escola

4.6. DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS

4.6.1. Categorização das variáveis

As variáveis foram sistematizadas em três categorias: variáveis biológicas, indicadores ambientais (de água, saneamento e habitação) e referência de viagem. A partir destas se estabeleceu as perguntas do questionário aplicado aos responsáveis dos alunos, que foram definidas e categorizadas como mostra o quadro abaixo.

Quadro 4.1. Categorização das variáveis

Variável	Definição	Categorização
Sexo		Masculino; Feminino
Idade	Em anos completos	4-8 9-11 12-15
Fonte de água para beber	Origem da água de beber da casa	Rede Pública: Sim; Não
Água encanada	Domicílio servido de água proveniente de uma rede geral de abastecimento, no domicílio	Sim; Não
Destino dos dejetos	Local onde segue o material de esgoto e sanitário da casa	Fossa; a céu aberto
Sanitário	Se tiver privada em casa	Sim; Não
Tipo de parede	Estilo das paredes da casa	Tijolo; Taipa; Lona e/ou Papelão
Viagem	Viajou ou chegou de outro Estado dentro de 6 meses	Sim; Não
Qual Estado?	Fora do Estado de Alagoas	

De acordo com dados do Ministério da Saúde (2006) a proporção de moradores da cidade de Maceió em 2000 apresentou as seguintes características quanto aos seus indicadores de saneamento: por tipo de abastecimento de água: na rede geral (81,7%), em poço ou nascente (6,6%) e outras formas (11,85%); por tipo de instalação sanitária: ligado à rede geral de esgoto ou pluvial (23,2%), fossa séptica (22,4%), fossa rudimentar (45,6%) e outras formas (6,15%).

4.6.2. Definição de caso

Foram considerados casos todos os alunos com diagnóstico de amebíase em três métodos: microscopia, *ENZYMEBA*® e teste *E. histolytica* II®. Os resultados através da microscopia e do teste *ENZYMEBA*® foram considerados positivos para *E. histolytica*/*E. dispar*.

4.7. OPERACIONALIZAÇÃO

4.7.1. Aplicação do Questionário

Foi utilizado o questionário como instrumento para obter as informações das variáveis pesquisadas. Os questionários foram aplicados pela investigadora e uma assistente de enfermagem, após treinamento.

A entrada nas escolas foi antecipada por alguns passos:

- ✓ Autorização para execução da pesquisa pela coordenação da Secretaria de Educação do Estado e do Município;
- ✓ Reunião com a direção das escolas sorteadas;
- ✓ Explicação sobre a pesquisa nas salas de aula selecionadas e em reunião com os responsáveis;
- ✓ Obtenção da permissão por escrito dos responsáveis pelos alunos;
- ✓ Garantia aos responsáveis, na declaração de consentimento, da privacidade das respostas ao questionário e dos resultados laboratoriais;
- ✓ Aplicação do questionário aos responsáveis ou diretamente aos alunos que cursavam a 4ª série em sala de aula.

4.7.2. Coleta das amostras de fezes e análise parasitológica

Foi entregue para todos os responsáveis que tinham preenchido o questionário e assinado o termo de consentimento um coletor de fezes, sem conservante. Todas as amostras coletadas, uma por aluno, foram transportadas

para o Laboratório Central do Estado de Alagoas (LACEN/AL), onde foram preparadas segundo as técnicas de concentração. A leitura das amostras foi realizada de início pela equipe do LACEN e depois pela equipe do programa de geohelmintos da cidade de Maceió, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas (ICBS/UFAL).

As amostras foram processadas no mesmo dia da coleta pelo método direto de formol-éter, para pesquisa dos parasitos em microscópio óptico (100x e 400x) e classificadas de acordo com o resultado do diagnóstico parasitológico como positivas ou negativas para *E. histolytica*/*E. dispar*. Para aumentar a sensibilidade do exame microscópico cada amostra foi revista por cinco técnicos, em cinco lâminas diferentes. Parte do material fecal foi mantido a -20°C para posterior investigação pelo ELISA.

4.7.3. Aplicação dos testes de ELISA: ENZYMEBA® e *E. histolytica* II®

Para um diagnóstico mais preciso foi definido como critério diagnóstico aplicar técnicas de maior sensibilidade como o ELISA, nas amostras positivas para *E. histolytica*/*E. dispar* à microscopia.

4.7.3.1. ENZYMEBA® (Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, Havana, Cuba).

O imunoensaio *ENZYMEBA*® permite detectar a infecção por uma ou ambas as espécies do complexo *E. histolytica*/*E. dispar*. Este teste apesar de não discriminar as duas espécies de ameba, foi empregado nas amostras positivas à microscopia como controle de qualidade do exame parasitológico, uma vez que confirma com precisão o exame microscópico. O teste foi realizado em colaboração com Dr. Luis Fonte do Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, segundo descrito na literatura (GALINDO *et al.*, 1998a). Esta técnica consiste no ensaio imunoenzimático em fase sólida para pesquisa de histolisina, uma protease excretada pela *E. histolytica*/*E. dispar*.

4.7.3.2. *E. histolytica* II[®] (TechLab Inc., Blacksburg, Estados Unidos)

É um teste imunoenzimático desenvolvido para detecção rápida da adesina (lectina inibidora de N-acetil-D-galactosamina), presente na membrana da *E. histolytica* em amostras fecais humanas. Define a presença da *E. histolytica* na amostra.

4.8. PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS

4.8.1. Microscopia: Método de Ritchie

Os sedimentos das amostras fixadas pelo método de Ritchie foram submetidos à identificação de cistos da *Entamoeba* e outros parasitos (LIKA-UFPE, 2001).

Concentração por centrifugação pelo formol-éter

Misturar 1g de fezes com 10 mL de solução salina a 0,85%

1. Coar em gaze num tubo cônico de centrifugação de 15 mL
2. Centrifugar a 2000 rpm por 1 minuto e decantar o sobrenadante
3. Juntar ao sedimento, 10 mL de formalina a 10%
4. Deixar em repouso durante 20-30 minutos
5. Ajuntar cerca de 2mL de éter. Tampar o tubo e agitar vigorosamente
6. Centrifugar a 1500 rpm durante 1 minuto
7. Limpar os detritos superficiais da parede do tubo com um bastonete
8. Decantar a mistura sobrenadante
9. Examinar o sedimento ao microscópio (x40)

4.8.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A aplicação do ELISA foi feita em dois momentos: primeiro foi aplicado o teste *ENZYMEBA*[®] nas amostras positivas à microscopia, e em segundo lugar se aplicou o teste *E. histolytica* II[®] nas amostras positivas ao *ENZYMEBA*[®].

4.8.2.1. *ENZYMEBA*[®]

Foi utilizada uma placa de poliestireno com 96 cavidades sensibilizadas com anticorpos antihistolisina. Os sítios não cobertos pelos anticorpos foram bloqueados por meio de incubação com soroalbumina bovina (BSA) e tampão fosfato (PBS). Após esta incubação o resto do agente bloqueador foi eliminado e foram somadas as amostras de fezes, em duplicata, diluídas previamente em água destilada (1g de fezes em 3 mL de água destilada).

Depois de 4 h em contato com a placa a 4°C, o material não capturado foi descartado depois de quatro lavagens e nas cavidades foram colocados 100 µL de 100 mM de Benziloxycarbonil-L Arginil-L Arginina 2-(4-metoxi,) glicina-EDTA pH 9,5, que contem L-cisteína 2mM.

Depois de 16 h de incubação a 37°C, a ação da enzima capturada foi revelada mediante a adição de 100 µL de uma solução que contem p-cloro de mercuribenzoato 5 mM, Fast garnet 22,5 mg/mL, EDTA 25 mM e TWEEN-20 a 1%, pH 6,0.

- Interpretação dos resultados:

O aparecimento imediato da cor rosa (de intensidade diferente) foi considerado como um resultado positivo, e nas cavidades cujo conteúdo continuou amarelo, foi considerado como resultado negativo. Em cada teste foram usados 2 controles (positivo e negativo).

4.8.2.2. *E. histolytica* II[®]

É um teste imunoenzimático desenvolvido para detecção rápida da adesina (lectina inibidora de N-acetil-D-galactosamina), presente na membrana da *E. histolytica* em amostras fecais humanas. Define a presença da *E. histolytica* na amostra.

O teste *E. histolytica* II utiliza anticorpos anti-adesina. As cavidades da microplaca (12 tiras, com 8 cavidades) contêm anticorpos policlonais imobilizados que se ligam a adesina da *E. histolytica*/*E. dispar*. O conjugado é um anticorpo monoclonal ligado a peroxidase específico para adesina de *E. histolytica*. No teste, uma alíquota do material fecal foi emulsificada no diluente e a amostra diluída foi transferida para a cavidade da microplaca. Se a adesina estava presente na amostra, se ligava ao conjugado e ao anticorpo policlonal imobilizado durante a fase de incubação. Todo material não ligado foi removido durante as etapas de lavagem. Seguindo-se da adição do substrato, uma cor foi detectada devido ao complexo enzima-anticorpo-antígeno que se forma em presença da adesina.

A interpretação dos resultados foi visual e espectrofotométrica:

- Visual: O Controle negativo não deve apresentar cor, ou no máximo uma cor amarela fraca. O Controle positivo deve apresentar cor amarela. Uma amostra foi considerada positiva se apresentou uma cor amarela quando comparada com o controle negativo. Ela pode ser mais ou menos amarela que a observada na cavidade do controle positivo. Uma amostra foi considerada negativa se a reação foi incolor ou com coloração amarela mais fraca que a do controle negativo.

- Espectrofotométrica: A microplaca foi lida no leitor de ELISA a 450nm. A leitura do controle negativo deveria apresentar um valor de absorbância de 0,150 ou menor. Subtraiu-se a leitura da cavidade do controle negativo das leituras das cavidades do controle positivo e das amostras. A leitura do controle positivo teria que fornecer um valor de absorbância maior que 0,500 após a subtração da absorbância do controle negativo. Uma amostra foi considerada positiva para a adesina se a leitura foi 0,050 ou maior após a subtração da leitura

do controle negativo. A amostra foi considerada negativa para a adesina se a leitura foi menor que 0,050.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram codificados e processados no programa de estatística EPI-INFO versão 6.04 (CDC, 1996). Foi adotada a dupla entrada de dados com uso do programa *Validate* para validação dos dados digitados. A significância estatística da associação da infecção pela *E. histolytica* foi avaliada pelo *Qui quadrado*, com um intervalo de confiança (IC) de 95%, com o valor de *p* igual ou menor que 0,05. Foi aplicado o teste de Fisher, quando o número de casos era menor cinco. Foi aplicado o *Qui-quadrado* para tendência para testar tendência em relação à idade, estratificada em faixas etárias.

Para comparar o exame microscópico com o teste de ELISA, o valor preditivo positivo (VPP) foi computado, assumindo o teste *E. histolytica* II® como padrão de referência (NESBITT *et al.*, 2004). O Valor preditivo positivo é a probabilidade que tem cada resultado positivo de ser, pelo teste, um caso. Não foi possível verificar a sensibilidade, especificidade e o valor preditivo negativo (VPN) pela ausência dos dados necessários. Matematicamente o VPP é igual ao número de verdadeiros positivos dividido pelo total de positivos reconhecidos no teste, multiplicados por 100 conforme a fórmula: (ALMEIDA FILHO e ROUQUAYROL, 2002).

$$\text{VPP} = \frac{\text{Nº de verdadeiros positivos}}{\text{Total de positivos no teste}} \times 100$$

4.10. ASPECTOS ÉTICOS

4.10.1. Resultados dos Exames Parasitológicos e Tratamento Antiparasitário

Todo indivíduo que entregou as amostras fecais recebeu o resultado de seu exame por escrito e informação sobre os cuidados para evitar as enteroparasitoses. Todos aqueles que apresentaram exame positivo, durante o estudo, receberam tratamento específico, com a devida prescrição, orientação e acompanhamento pela investigadora. Foram dirigidas, nas salas de aula dos alunos que participaram da pesquisa, medidas preventivas e alertado sobre os perigos da contaminação por parasitos para todos alunos.

4.10.2. Termo de consentimento livre e esclarecido

Os responsáveis pelos alunos foram devidamente esclarecidos sobre os objetivos do projeto, e assinaram um termo de consentimento (Apêndice 1) informando a sua participação, conforme normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas que aprovou este estudo (Processo nº 009057/02-95). (Anexo 1)



5 Resultados



5.1. CARACTERIZAÇÃO GERAL DA AMOSTRA

Durante o período de estudo foram analisadas amostras de fezes de 1.798 alunos com idade entre 4 – 15 anos, de 18 escolas da rede pública distribuídos em 15 bairros da cidade de Maceió. Dos alunos pesquisados um pouco mais da metade foi do sexo feminino (51,4%), e a faixa etária mais freqüente se encontrou entre 8 – 11 anos (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Distribuição de alunos da rede pública de Maceió, segundo idade e sexo

Faixa etária (anos)	SEXO		Total
	Masculino	Feminino	
4 – 7	180 (48,3%)	193 (51,7%)	373 (20,7%)
8 – 11	560 (47,2%)	626 (52,8%)	1186 (66,0%)
12 – 15	133 (55,6%)	106 (44,4%)	239 (13,3%)
Total	873 (48,6%)	925 (51,4%)	1798

$\chi^2 = 5,68$
 $p = 0,0585$

5.1.1. Condições ambientais e referência de viagem

Descrevendo as condições de água, saneamento e habitação foram referidos que a maioria das residências dos alunos era abastecida com água encanada (95,2%), tinham água tratada para beber (93,7%), sanitário em casa (95,6%), fossa (81,1%) e as paredes da casa eram de tijolo ou bloco (94,9%).

Quando questionados se tinha viajado nos últimos seis meses, apenas 7% dos alunos estavam nesta condição. Desses, 38,1% tinham viajado para Pernambuco, 12,7% para São Paulo e o restante não referiu ter viajado.

5.2. PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PELA *Entamoeba histolytica*

Foram aplicados três exames em série: Microscopia óptica, *ENZYMEBA*® e *E. histolytica* II®. A microscopia foi realizada em todas as amostras fecais e apresentou uma prevalência de 3,8% de *E. histolytica*/*E. dispar*. As amostras positivas à microscopia foram submetidas ao teste de imunoenensaio *ENZYMEBA*® que confirmou todos os resultados positivos para *E. histolytica*/*E. dispar*. O terceiro exame o *E. histolytica* II®, foi aplicado às amostras positivas pelo teste *ENZYMEBA*®, e determinou a prevalência de 1,0% da *E. histolytica* em alunos das escolas públicas de Maceió (Figura 5.2).

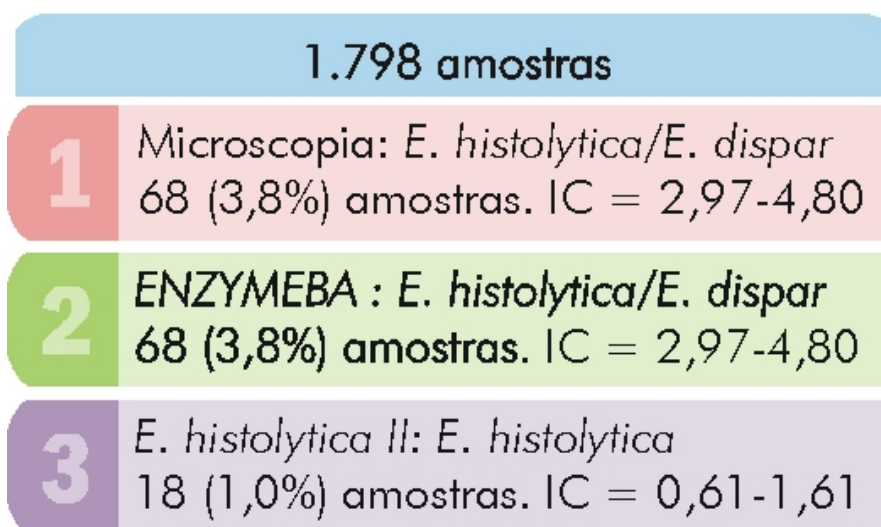


Figura 5.1. Fluxograma dos exames de diagnóstico

A Figura 5.2 mostra a placa do exame de detecção do antígeno de *E. histolytica* nas fezes pelo teste de ELISA *E. histolytica* II® com a identificação visual dos casos, sendo os negativos incolor e os positivos de coloração mais ou menos amarela que o controle positivo.

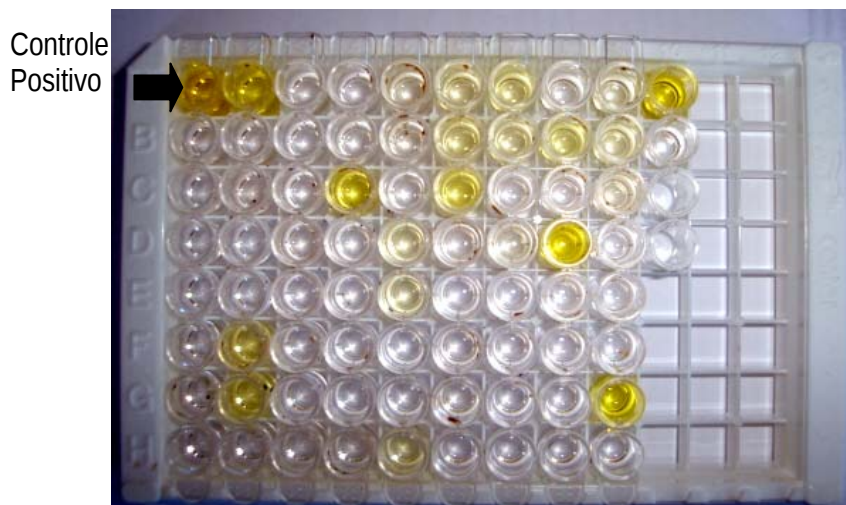


Figura 5.2. Placa do ELISA *E. histolytica* II®

5.2.1. Localização geográfica

A figura 5.3 mostra o mapa de Maceió, focalizando os bairros que foram selecionados e pontuam os 18 casos de infecção de *E. histolytica* por bairro. Foram identificados casos em 10 escolas, distribuídos em 8 bairros. Vale salientar que 6 destes alunos eram de uma mesma escola, dos quais 4, da mesma classe e 2 alunos de uma outra escola, também da mesma classe.

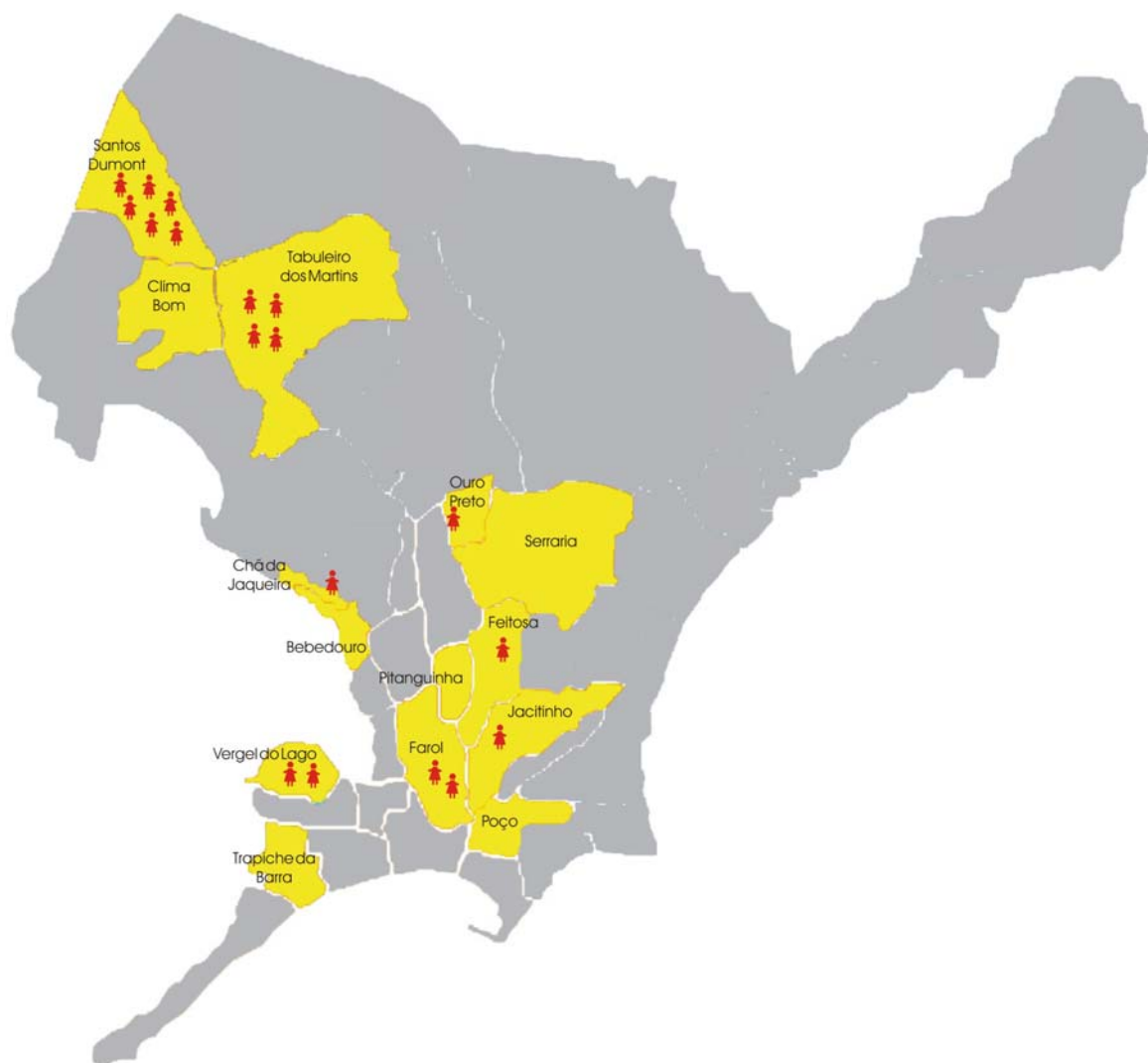


Figura 5.3. Mapa de Maceió localizando os bairros sorteados para análise da amostra de escolares quanto à presença de amebíase e número de casos detectados

5.2.2. Valor Preditivo para diagnóstico específico da *E. histolytica*

Para estimar a validade do exame microscópico, foi calculado o valor preditivo. Considerando como padrão de referência o teste de ELISA *E. histolytica* II, foi observado que o resultado do valor preditivo positivo (VPP) da microscopia

foi avaliado em 26,4%. A sensibilidade, especificidade e valor preditivo negativo (VPN) não foram possíveis calculá-los por falta de dados.

$$VPP = \frac{18}{68} \times 100 = 26,4\%$$

5.2.3. Prevalência da infecção pela *E. histolytica* em relação à idade dos alunos

Comparando as três técnicas realizadas em relação à idade, se observou um aumento da frequência do diagnóstico de *E. histolytica*/*E. dispar* pela microscopia e pelo teste *ENZYMEDIA*® proporcional ao aumento da idade dos alunos ($p=0,045$). Ao contrário, pelo resultado do teste *E. histolytica* II®, a infecção se manteve constante nas duas primeiras faixas etárias, com redução entre 12-15 anos, sem diferença significativa (Tabela 5.2).

Tabela 5.2. Prevalência da infecção pela *E. histolytica* segundo a idade dos alunos das escolas públicas da cidade de Maceió, Alagoas.

Idade	n	Infecção detectada por		
		Microscopia*	ENZYMEBA [†]	<i>E. histolytica</i> II [§]
4 – 7	373	6 (1,6%)	6 (1,6%)	4 (1,1%)
9 – 11	1186	51 (4,3%)	51 (4,3%)	13 (1,1%)
12 – 15	239	11 (4,6%)	11 (4,6%)	1 (0,4%)
	1798	68 (3,8%)	68 (3,8%)	18 (1,0%)
<i>p</i>		0,045	0,045	0,623
χ^2		6,16	6,16	0,95
χ^2 para tendência		4,62	4,62	0,46
<i>p</i>		0,03	0,03	0,49

* Fezes examinadas pela microscopia para cistos de *E. histolytica*/E. *dispar*.

[†] O antígeno *E. histolytica*/E. *dispar* foi detectado usando ENZYMEBA[®]

[§] O antígeno *E. histolytica* foi detectado usando o teste *E. histolytica* II[®]

5.2.4. Prevalência da infecção pela *E. histolytica* em relação ao sexo dos alunos

Em relação ao sexo, foi observado que nas duas técnicas a prevalência de *E. histolytica*/E. *dispar* foi um pouco maior nos meninos que nos meninas, embora sem significância estatística (microscopia: $p=0,713$; ENZYMEBA[®]: $p=0,713$). No grupo de alunos avaliados pelo teste específico para *E. histolytica* foi verificado que 11 (1,3%) alunos do sexo masculino e 7 (0,8%) do sexo feminino estavam infectados pela *E. histolytica* sem diferença significativa. ($p=0,404$).

5.2.5. Condições ambientais e referência de viagem

Foi referido pelos responsáveis dos alunos infectados que 83,3% bebiam água tratada; 94,4% das casas tinham água encanada; todas tinham sanitário; 72,2% tinham fossa e 94,4% tinham suas paredes de tijolo. A condição de ter viajado nos últimos seis meses não mostrou relação com a infecção pela *E. histolytica*.

5.2.6. Análise das Perdas

Foi considerado como grupo de perda os alunos que responderam ao questionário, mas não entregaram as amostras de fezes e o grupo de análise os alunos que foram estudados na pesquisa.

O grupo de perdas não apresentou diferenças em relação ao grupo analisado quanto ao sexo, porém na idade foi observada uma diferença significativa quando os alunos foram divididos em faixas etárias (Tabela 5.3). Quanto às características ambientais de água, saneamento e habitação só foram verificados diferenças na condição de destino dos dejetos ($p=0,00$).

Tabela 5.3. Comparação entre os grupos de perdas e análise segundo sexo e idade de alunos das escolas públicas da cidade de Maceió, Alagoas.

	SEXO		IDADE (anos)		
	Masculino	Feminino	4 – 7	9 – 11	12 – 15
PERDAS	365 (50,6%)	356 (49,4%)	142 (19,7%)	417 (57,8%)	162 (22,5%)
ANÁLISE	873 (48,6%)	925 (51,4%)	373 (20,7%)	1186 (66,0%)	239 (13,3%)
P	0,370		0,00		
χ^2	0,347		32,84		

5.3. PREVALÊNCIA DAS PARASITOSEs

Todas as amostras também foram analisadas quanto à presença de protozoários e helmintos, a partir do emprego do método parasitológico de Ritchie. Foi verificado que 698 (38,8%) alunos apresentaram infecção com um ou mais parasitos. A prevalência entre os alunos do sexo masculino foi de 37,1% e no sexo feminino de 40,7%. A frequência de parasitos em relação à faixa etária variou entre 38,4% e 41,4%, sendo a idade entre 12-15 anos a que apresentou maior frequência. *Ascaris lumbricoides* foi o helminto mais freqüente, tendo sido encontrado em 16,5% (296/1798) das amostras, seguido do *Trichuris trichiura* (12,1%) e *Entamoeba coli* (11,2%).

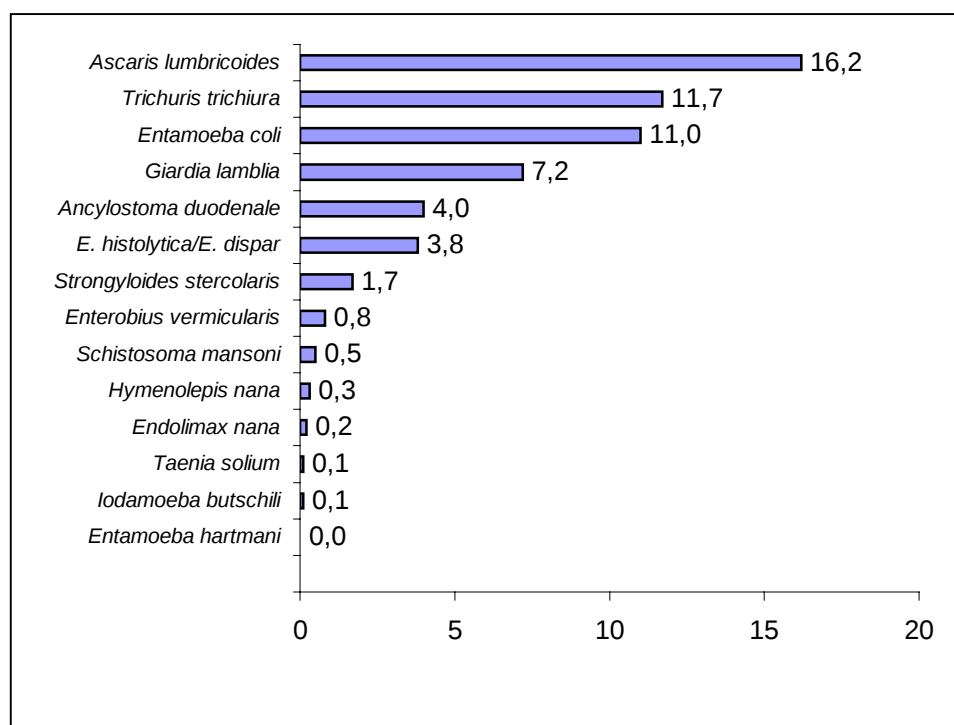


Gráfico 5.1: Distribuição dos alunos de escola da rede pública do Município de Maceió, segundo tipo de parasito.



6 Discussão



A prevalência da amebíase tem sido demonstrada no Estado de Alagoas, como parte de estudos sobre enteroparasitoses (DACAL et al., 1984; FONTES et al., 2003), utilizando para diagnóstico o exame microscópico. Este foi o primeiro estudo dirigido especificamente para verificação da epidemiologia da amebíase na cidade de Maceió-AL. Isso implicou determinar de forma específica a *E. histolytica*, aplicando o teste de detecção do antígeno para *E. histolytica*, segundo as recomendações da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1997b).

A prevalência de *E. histolytica* em alunos de escolas públicas da cidade de Maceió, foi de 1,0% (18/1798), determinada pelo teste *E. histolytica* II[®]. Pela microscopia, 50 casos a mais iriam ser incluídos como amebíase, apesar de não estarem infectados com a *E. histolytica* e conseqüentemente não necessitarem de tratamento. Dependendo da população estudada, os métodos coproscópicos podem subestimar ou superestimar a prevalência da doença.

No Brasil, Braga et al. (1998, 2001a), em amostras de fezes de 735 indivíduos, em Fortaleza-CE, encontraram uma prevalência de *E. histolytica* de 14,9% e de 25,4% para *E. histolytica/E. dispar*. Por outro lado, estudo realizado em 3 cidades diferentes de Pernambuco, em 663 indivíduos com idade até 40 anos, Aca et al. (1994) não verificaram evidência da presença de cepas invasivas de *E. histolytica*, apesar da detecção de *E. histolytica/E. dispar* pela microscopia ter se apresentado entre 18,0%, 31,5% e 36,3%. Após 10 anos, Pinheiro et al. (2004), em 1437 amostras analisadas de uma população de outra cidade de Pernambuco, também não detectou a presença de *E. histolytica* pela aplicação do método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), e foi observada que a prevalência de *E. histolytica/E. dispar* de 4,1%, se encontrava bem mais diminuída em relação ao estudo anterior.

O estudo de Dacal et al. (1984), realizado em 328 indivíduos de duas favelas da cidade de Maceió, avaliou a prevalência para *E. histolytica* de 8,0% e o de Fontes et al. (2003), em 1.020 estudantes da cidade de Barra de Santo Antônio, de 19,8%. A diferença marcante na prevalência entre estas pesquisas e o atual estudo realizado com 1.798 amostras de alunos de 18 escolas públicas da

cidade de Maceió, se deu provavelmente pela aplicação do exame específico como também pelas condições ambientais específicas

O exame microscópico continua sendo o método mais utilizado para o diagnóstico da amebíase não só em Maceió, mas em diversas partes do mundo (HUSTON et al., 1999a; NOZAKI, 2000; WALSH, 1986). Entretanto a microscopia é incapaz de distinguir a *E. histolytica* da *E. dispar*, que são morfologicamente idênticas (TANYUKSEL e PETRI, 2003). Não se tem documentado que a *E. dispar* tenha causado algum caso de colite ou abscesso hepático. A *E. histolytica* é a responsável por todos os casos de colite e abscesso hepático, como também pela colonização assintomática. Como a colonização da *E. dispar* é muito mais comum que a infecção pela *E. histolytica* e não deve ser tratada, tem sido dado grande ênfase para o desenvolvimento de testes que possam ser aplicados e distingam as infecções causadas pelas duas amebas (DELIALIOGLU et al., 2004; HAQUE et al., 1995; WHO, 1997b).

O diagnóstico pela microscopia apresenta baixa sensibilidade. Haque et al. (1997) verificaram em pesquisa realizada com crianças em Bangladesh, que a microscopia apresentava sensibilidade de 37% quando comparada à cultura. O encontro de falso-positivos pela microscopia no diagnóstico da amebíase é muito comum. Além da impossibilidade de diferenciar a *E. histolytica* da *E. dispar*, o microscopista pode confundir a *E. histolytica* com outras *Entamoeba* de morfologia semelhante (DOGANCI et al., 1997; PILLAI et al., 1999; TANYUKSEL e PETRI, 2003).

A conclusão dos peritos da OMS (WHO, 1997b) de correlacionar a amebíase invasiva com trofozoítos apresentando eritrócitos fagocitados, quando o diagnóstico fosse realizado pela microscopia, é uma questão não resolvida, desde que trofozoítos de outras espécies de amebas intestinais não patogênicas podem conter trofozoítos e a *E. dispar* pode também conter eritrócitos, além do que, a detecção de trofozoítos não faz parte do conhecimento tradicional dos laboratórios (ACKERS, 2002; HAQUE et al., 1995; KEBEDE et al., 2004). Tanyuksel et al. (2005), em 380 amostras fecais coletadas na Turquia, refere ter sido raro a ingestão de células vermelhas pela *E. histolytica*. O encontro de trofozoítos com

eritrócitos não foi observado neste estudo. Além da dificuldade para detecção pelos microcopistas, as fezes devem ser observadas dentro de 20 minutos após coletada e trofozoítos móveis contendo eritrócitos ocorre durante a amebíase invasiva, situação incomum em nosso meio (HAQUE et al., 2003; TANYUKSEL et al., 2005; WALSH, 1988).

Vários estudos indicam que o valor preditivo positivo (VPP) da microscopia no diagnóstico da amebíase é considerado muito baixo. Isto indica que cada exame positivo pela microscopia tem pouca probabilidade de ser realmente um caso. Nesbitt et al. (2004) comparando a microscopia e o teste de ELISA em 842 amostras encontraram uma sensibilidade de 43% e um VPP de 5%. No Canadá foi verificado o VPP da microscopia de 27,3%, tendo como referência dois testes de ELISA, em 112 pacientes de risco para amebíase: homossexuais masculinos, imigrantes dos trópicos e viajantes no período de seis meses (PILLAI et al., 1999). Na análise das 1.798 amostras deste estudo, comparando com o teste de ELISA foi observado que a microscopia apresentou um VPP de 26,4%. Portanto, mesmo diante de pacientes sintomáticos com exame microscópico positivo para *E. histolytica*/*E. dispar*, deve-se sempre pensar em outras alternativas, que não seja apenas a amebíase (KEBEDE et al., 2004).

No sentido de confirmar a infecção de *E. histolytica*/*E. dispar* diagnosticada pela microscopia, cada amostra positiva foi analisada pelo teste *ENZYMEBA*[®]. Esta técnica apresenta sensibilidade e especificidade maior que 90%, quando comparada a três exames coproscópicos (GALINDO et al., 1998a). Uma das limitações no estudo da amebíase encontra-se na excreção intermitente dos cistos. Particularmente nos indivíduos que são portadores assintomáticos ou que não têm colite disenterica, que excretam os cistos de forma intermitente. O exame de três amostras em dias separados aumenta a chance de identificação dos infectados em 60–80% (WALSH, 1986).

Neste estudo os resultados do *ENZYMEBA*[®] coincidiram com todas as observações pela microscopia. Considerando a eliminação cíclica dos cistos, este resultado foi muito satisfatório, desde que a pesquisa se realizou com uma única amostra de fezes por indivíduo. Talvez esta questão tenha sido atenuada, devido

ao controle de qualidade instituído pelo laboratório de geohelmintos do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS/UFAL), de cinco lâminas para cada amostra fecal. A concordância em 100% entre os resultados da microscopia e do teste *ENZYMEBA*[®] foi também observada por Galindo et al. (1998a), sendo que este resultado só foi obtido quando foram utilizadas três amostras de fezes na microscopia. Ele verificou que a concordância aumentava à medida que aumentava o número de amostras por indivíduo. Esta é uma das grandes vantagens do *ENZYMEBA*[®], sendo necessário o uso de uma única amostra para o diagnóstico preciso, além de não utilizar o leitor de ELISA, instrumento sofisticado, que pode não ser acessível com facilidade em laboratórios de análise clínica.

Na comparação entre os testes de microscopia e *ENZYMEBA*[®], Fonte et al. (1998) demonstraram em 288 indivíduos de três hospitais de Cuba um grande número de resultados falso-positivos para *E. histolytica*/*E. dispar* pela microscopia. Muitos fatores podem afetar de forma negativa o resultado do exame microscópico, como a habilidade dos microscopistas, tempo e maneira de coleta das amostras, uso de medicação e dificuldade na diferenciação entre as diversas espécies de *Entamoeba*. Neste sentido a morfologia das amebas intestinais, como a *E. histolytica*, *E. coli*, *E. hartmanni*, e *Iodameba bütschlii*, são semelhantes e muitas vezes de difícil identificação pelo exame microscópico (TANYUKSEL e PETRI, 2003). A aplicação do *ENZYMEBA*[®] pela detecção da protease histolisina específica das duas espécies de *Entamoeba* (*dispar* e *histolytica*), permitiu reduzir este viés de medição na pesquisa. Em que pese às vantagens da aplicação deste exame, porém, ele não permite diferenciar a *E. histolytica* da *E. dispar* (GALINDO et al., 1998b).

De acordo com as recomendações da OMS (WHO, 1997a) é ideal para as pesquisas de amebíase a aplicação de testes que especifiquem a *E. histolytica*. Alguns estudos têm sido realizados em Estados do Brasil utilizando métodos específicos para detecção da *E. histolytica*. Em Governador Valadares (Minas Gerais), foram diagnosticados pela microscopia 51 indivíduos com cistos de *E. histolytica*/*E. dispar*, dos quais apenas três foram positivos para *E. histolytica* pelo método de ELISA (SILVA et al., 2005). No Pará, Póvoa et al. (2000) identificaram

28,99% de positividade, com vários casos de amebíase invasiva e Silva et al. (2005), encontrou 29,35% de positividade para *E. histolytica*, aplicando o método de detecção do antígeno. Em São Paulo, de 27 casos com microscopia positiva para *E. histolytica*/ *E. dispar*, só um foi positivo para *E. histolytica* pela aplicação do teste de ELISA (RIBEIRO et al., 2001). Em Pernambuco, a aplicação dos métodos de análise isoenzimática, ELISA e Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) não detectaram a presença de *E. histolytica*, só *E. dispar* (ACA et al., 1994; PINHEIRO et al., 2004). Em Fortaleza, Braga et al. (1998; 2001a) encontraram prevalência entre 10,6% e 14,9% desta infecção, detectados pelo ELISA. É, pois de se deduzir que a prevalência da amebíase no Brasil se apresenta com muitas diferenças de acordo com o Estado. Seria de grande importância prosseguir com as pesquisas e avaliar a epidemiologia desta protozoose em todo o país utilizando métodos específicos.

A aplicação do teste de detecção do antígeno *E. histolytica* II[®] permite identificar a *E. histolytica* para uma sensibilidade que pode variar de 86% – 95% e uma especificidade de 98% – 99% (HAQUE et al., 1995, 1997). Comparando o teste de detecção do antígeno *E. histolytica* II[®] com a PCR e a análise isoenzimática, considerados como padrão de referência, foi demonstrado por Haque et al. (1998) uma correlação maior que 90% entre os resultados dos três métodos. Esta verificação permitiu indicar qualquer uma destas técnicas isoladamente para a pesquisa da infecção pela *E. histolytica*. Entretanto, destas técnicas, o teste de detecção do antígeno *E. histolytica* II[®] foi o mais rápido e simples, dando uma resposta dentro de três horas. Em contraste a aplicação da PCR utiliza material sofisticado e de alto custo, e a análise isoenzimática necessita de uma a duas semanas para realização da cultura (EVANGELOPOULOS et al., 2001; DiMICIELI, 2004; MIRELMANN et al., 1997; NÚÑEZ et al., 2001).

É possível a identificação específica da *E. dispar* pela aplicação da PCR e da análise isoenzimática, que como foi referido, são métodos de grande complexidade. No entanto, Haque et al. (1995) utilizando o teste *E. histolytica* II[®] após aplicação de um teste de triagem semelhante ao *ENZYMEBA*[®], o teste *Entamoeba*[®] (TechLab Inc., Blacksburg, Estados Unidos) diferenciou a *E.*

histolytica da *E. dispar*, de forma bem mais rápida que o teste de análise isoenzimática. Para 52 culturas positivas, de 202 amostras de indivíduos com diarreia, na qual a análise de zimodema poderia dividir em *E. histolytica* e *E. dispar*, o teste específico *E. histolytica* II[®] identificou corretamente 21 de 22 infecções pela *E. histolytica* e 28 de 30 infecções pela *E. dispar*, com sensibilidade de 95% e especificidade de 93%. Seguindo esta mesma estratégia Nesbitt et al. (2001) avaliaram 842 amostras de Kilimanjaro, na Tanzânia, e aplicou o teste *Entamoeba*[®] seguido do teste *E. histolytica* II[®] considerando a *E. dispar* como o resultado dos positivos do Teste *Entamoeba*[®] menos o número dos positivos pelo teste *E. histolytica* II[®]. Ele concluiu que a prevalência de *E. histolytica* foi 1% e de *E. dispar* 7,3%.

Aplicando este caminho metodológico para esta pesquisa, das 68 (3,8%) amostras positivas para *E. histolytica*/*E. dispar*, pelo teste *ENZYMEBA*[®], apenas 18 (1,0%) amostras foram positivas para o teste *E. histolytica* II[®]. Como resultado se observou que 50 (2,8%) amostras poderiam ser classificadas como *E. dispar*. Isto demonstra que a infecção pela *E. dispar* foi quase quatro vezes mais prevalente que a infecção pela *E. histolytica*.

Comparando os métodos de diagnóstico (Tabela 5.2) se observa que o teste *ENZYMEBA*[®] superestimou a prevalência da infecção pela *E. histolytica*. Núñez et al. (2001) em amostras de fezes coletadas de dois hospitais e 13 clínicas de uma província de Cuba, confirmaram com o teste *ENZYMEBA*[®] 49 amostras diagnosticadas pela microscopia para *E. histolytica*/*E. dispar*. Ao comparar com a técnica da PCR foram verificados que 36 (75,5%) amostras eram positivas para *E. dispar* e 13 (24,5%) mostraram infecções mistas com as duas espécies. Este resultado revelou que a aplicação do teste *ENZYMEBA*[®] confirmou uma das duas espécies, com concordância em 100% com a PCR, considerada padrão de referência. No entanto, como a *E. dispar* é muito mais prevalente do que a *E. histolytica*, é provável sempre apresentar uma superestimativa em relação à prevalência da *E. histolytica*. Este padrão de resposta também se apresenta com a aplicação do teste *Entamoeba*, Haque et al. (1999) em uma favela urbana de Dhaka, Bangladesh, em 680 crianças de 2-5 anos de idade, observaram uma

prevalência de 17,3% de *E. histolytica*/*E. dispar* pelo teste *Entamoeba*® e de 4,7% de *E. histolytica* pelo teste de detecção do antígeno. Da mesma forma, Braga et al. (2001a), em 599 indivíduos de uma favela da cidade de Fortaleza – CE, encontraram resultado aumentado no teste *Entamoeba*® (25%) com resultado de 15% para *E. histolytica* especificamente.

Evangelopoulos et al. (2001) no primeiro estudo realizado na Grécia após a redefinição da *E. histolytica* como duas espécies, avaliaram 322 indivíduos e revelaram pela PCR 26 amostras positivas para *E. dispar*. Esta prevalência foi atribuída às precárias condições de moradia e higiene. Concluiu-se que a transmissão e a prevalência de parasitos considerados não patogênicos, em especial a *E. dispar*, foi diretamente associado com o padrão de vida. O índice de desenvolvimento humano (IDH) avalia educação, longevidade e renda. A cidade de Maceió, em 2004 apresentou IDH abaixo das médias nacional e das capitais (PNUD, 2006). Das 1798 amostras analisadas da cidade de Maceió, foram identificadas 50 amostras que não eram *E. histolytica* com grande possibilidade de serem *E. dispar*. Este aumento da prevalência pode ser explicado por constantes reinfecções ao longo da vida, com colonização do parasito.

Na tabela 5.2 se observa que a aplicação dos testes da microscopia e *ENZYMEBA*® apresenta aumento da prevalência da *E. histolytica*/*E. dispar* de acordo com o aumento da idade. Apesar das diferenças de prevalência da *E. histolytica*/*E. dispar* entre as faixas etárias a aplicação do qui-quadrado de tendência demonstrou que este aumento foi significativo ($p= 0,03$) e constante entre uma faixa etária e outra.

Quanto aos infectados pela *E. histolytica* verificou-se outro padrão de resposta, mantendo-se a infecção invariável nas primeiras duas faixas etárias: de 4-8 e 9-11 anos de idade. Ao observar a tabela 5.3 que avalia as diferenças entre o grupo analisado e o grupo de perdas, verificou-se uma diferença significativa em relação à idade, chamando atenção na faixa etária entre 12-15 anos. Este viés de seleção poderia justificar a diminuição da prevalência da *E. histolytica* apresentada nesta faixa etária, porém outros estudos encontraram o mesmo padrão de resposta. Em Fortaleza, Braga et al. (2001b) observaram um pico de prevalência

na faixa etária de 1-5 anos de idade, sem redução marcante com a idade. Este dado sugere uma exposição contínua para o parasito como também que a imunidade existente não permitiu proteção contra novas infecções. No entanto foi demonstrado que após os 11 anos a prevalência de infectados apresentou redução (Tabela 5.2). Rivera et al. (1998), em comunidade das Filipinas observaram que a prevalência de infectados era alta na faixa etária entre 5-14 anos, com diminuição da taxa de infecção após esta idade. Esta redução poderia ser explicada pela diminuição à exposição dos indivíduos ao parasito. Talvez com o aumento da idade, as crianças vieram ter mais conhecimento sobre os riscos de contaminação das enteroparasitoses.

Não foi observada relação da infecção pela *E. histolytica* com o sexo dos alunos. Este achado foi também observado por Haque et al. (1999), em Bangladesh; por Blessmann et al. (2002) no Vietnã e Braga et al. (2001a), em Fortaleza.

A análise da amostra dos escolares quanto à presença de *E. histolytica* nas escolas demonstrou que quatro (22%) dos 18 alunos infectados pela *E. histolytica* estudavam em uma mesma sala de aula, o que pode sugerir a possibilidade de transmissão entre os mesmos, embora se reconheça que a contaminação familiar é muito mais significativa. A amebíase é transmitida pela contaminação fecal na água de beber e na comida, com mãos ou objetos sujos, contato sexual anal e condições precárias sanitárias e de higiene (NESBITT et al., 2004). Em estudo sobre a epidemiologia da *E. histolytica* em 28 famílias de uma comunidade de Fortaleza, foi demonstrado que 73% dos contatos familiares eram também colonizados com *E. histolytica* e apenas um membro da família infectado era um importante fator de risco para infecção de toda família (BRAGA et al., 2001b).

Uma questão em discussão é sobre a indicação de tratamento dos indivíduos com microscopia positiva para *E. histolytica*/*E. dispar*, sem a identificação específica da *E. histolytica*. De acordo com as recomendações da OMS (WHO,1997b), nos pacientes sintomáticos, não se deve assumir que a *E. histolytica* é a causa dos sintomas e outras explicações devem ser consideradas. Nos indivíduos assintomáticos o tratamento não é apropriado, a menos que

existam razões para suspeitar de infecção pela *E. histolytica*, como: títulos altos de anticorpos específicos, história de contato com amebíase invasiva ou um surto de amebíase. No entanto, deve-se considerar sua participação no ciclo extra-intestinal da amebíase e no risco de desenvolver a doença. Portanto, conclui-se que é necessário empregar métodos possíveis que permitam confiabilidade para o diagnóstico da infecção pela *E. histolytica* (DiMICIELI, 2004; HAQUE et al., 1999; SÁNCHEZ-GUILLÉN et al., 2002; SILVA et al., 2005). Há de se considerar, porém, que o emprego da microscopia das fezes, devido à sua praticidade e baixo custo, continua a desempenhar seu papel, no suporte para o diagnóstico de várias parasitoses.

A análise das fezes pela microscopia óptica mostrou infecção com vários parasitos intestinais (Gráfico 5.1). Em Belém, na análise de 845 amostras fecais o helminto mais freqüente foi o *Trichuris trichiura* tendo sido encontrado em 8,3% (28/334) das amostras, seguido dos ancilostomídeos (7,78%) e *Ascaris lumbricoides* (7,18%) (SILVA et al., 2005). Em estudo com 454 alunos de 6-10 anos de escolas públicas da cidade de Maceió, foi identificado como parasitos mais frequentes: *Ascaris lumbricoides* (22%), *Giardia lamblia* (9,9%), *Trichuris trichiura* (6,7%) e ancilostomídeos (1,5%) (SANTOS, 2001). A infecção pela *E. coli* foi a de maior prevalência entre os protozoários, na análise das 1.798 amostras deste estudo. Vale ressaltar que entre os 18 alunos infectados com *E. histolytica*, 15 (83,3%) foram positivos também para *E. coli*.

Os estudos sobre amebíase apresentam algumas limitações que devem ser evitadas (WALSH, 1986). A primeira delas se refere a amostras não representativas da população, com utilização de pacientes hospitalizados ou atendidos em ambulatórios. A segunda limitação diz respeito à dificuldade de aplicar um método rápido e fácil, com capacidade de distinguir entre a ameba patogênica e a não patogênica, que não necessite de equipamentos sofisticados e técnicos treinados. A última limitação trata-se da excreção intermitente dos cistos nas fezes. A maioria dos estudos examina apenas uma amostra por indivíduo, o que leva a uma diminuição da detecção dos infectados.

Em relação a estas considerações, no aperfeiçoamento desta investigação, foram analisadas 1.798 amostras, com uma metodologia balizada nos princípios da amostragem equiprobabilística em múltiplos estágios, de escolas selecionadas aleatoriamente. Os métodos de diagnóstico foram aplicados em série, com sensibilidade e especificidade maior que 90%, quando comparados ao padrão de referência e de fácil execução. E atendendo à última questão, a aplicação dos testes de ELISA dispensou a utilização de amostras seriadas. Todavia, apesar de todo empenho, foi observado que houve um número de perdas que por prudência foi avaliado e comparado ao grupo analisado segundo suas características biológicas e ambientais, verificando-se que não houve prejuízo à pesquisa, considerando a existência de apenas duas diferenças significantes (faixa etária e condição de destino dos dejetos) (Tabela 5.3).

Mediante os resultados deste estudo é importante rever sobre o conhecimento da epidemiologia e diagnóstico da amebíase em Maceió, considerando que a maior parte dos resultados encontrados pela microscopia foi falso-positivo, sem necessidade de tratamento. Atualmente o diagnóstico da amebíase em Maceió é determinado pela microscopia, e como foi visto, tem VPP muito baixo, sem apresentar confiabilidade no resultado positivo. A aplicação de testes rápidos, específicos e de precisão como o teste de detecção do antígeno, o *E. histolytica* II[®], utilizado nesta pesquisa, permitiu distinguir com facilidade entre as duas espécies de *Entamoeba*. As aplicações destes testes são mais caras que a do exame microscópico, mas reduz de forma evidente a indicação de tratamentos desnecessários e diagnósticos errados de amebíase.



7 Conclusões



Repensar sobre o diagnóstico da amebíase em Maceió

Considerando que:

- A maioria dos resultados pela microscopia foi falso-positivo;
- A aplicação do Teste *E. histolytica* II foi de fácil aplicação e permitiu a identificação específica da *E. histolytica*;
- A prevalência real da *E. histolytica* foi de 1,0% (18/1798) e não 3,8% (68/1798);
- A prevalência da *E. dispar* foi de 2,8%, quase quatro vezes maior que a prevalência da *E. histolytica*;
- Evitou-se o tratamento desnecessário de 50 (73,5%) crianças.

Os resultados deste trabalho permitem que medidas possam ser indicadas, como:

- Informação aos profissionais de saúde sobre a existência da *E. histolytica* e *E. dispar* em Maceió;
- Informação sobre a importância do diagnóstico específico da *E. histolytica* para definição do tratamento;
- Sugestão aos laboratórios de análise clínica para modificar o registro de cistos de *E. histolytica* para *E. histolytica/E. dispar*, quando o diagnóstico for feito pela microscopia e a possibilidade de implantação dos testes específicos;
- Novos estudos imunológicos poderão ser aplicados, utilizando o método da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) com o propósito de avançar nestes resultados e identificar a existência de diferentes cepas.



Referências



ABD-ALLA, M.D.; JACKSON, T.F.H.G.; REDDY, S.; RAVDIN, J.I. Diagnosis of Invasive Amebiasis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Saliva to Detect Amebic Lectin Antigen and Anti-Lectin Immunoglobulin G Antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, 38 (6), 2344-2347, June 2000.

ACA, I.S.; FRANÇA,Jr. E.; NOZAKI, T.; FREITAS, G.B.; TATENO, S. *Entamoeba histolytica* zymodemes in children of Osasco, São Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, 35(6), 581-582, 1993.

ACA, I.S.; KOBAYASHI S.; CARVALHO Jr. L.B.; TATENO, S; TAKEUCHI T. Prevalence and Pathogenicity of *Entamoeba histolytica* in three different regions of pernambuco, Northeast Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, 36(6), 519-524, 1994.

ACKERS, J.P. The diagnostic implications of the separation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. **Journal Bioscience**. 27(6)Suppl.3, Nov.2002.

ALMEIDA FILHO, N.; ROUQUAYROL, M.Z. **Introdução à Epidemiologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro:Editora Médica e Científica Ltda, 2002.

BLESSAMAN, J.;VAN, L.P.;NU, P.A.T.; THI, H.D.; MULLER-MYHSOK, B.; BUSS, H; TANNICH, E. Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in Central Vietnam. **American Journal Tropical and Medicine Hygiene**, 66(5), 578-583, 2002.

BONILLA, L.C. Relevancia del reconocimiento de *Entamoeba dispar* en la Amibiasis. **Invest Clin**. 42(3), 157-159, 2001.

BRAGA, L.L.B.C.; MENDONÇA, Y.; PAIVA, C.A; SALES, A.; CAVALCANTE, A.L.M.; MANN, B.J. Seropositivity for and intestinal colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in individuals in Northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, 3044-3045, Oct, 1998.

BRAGA, L.L.B.C.; GOMES, M.L.; SILVA, M.W.; PAIVA, C.A.; SALES, A.; MANN, B.J. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections as detected by monoclonal antibody in na urban slum in Fortaleza, Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 84(5), 467-471, 2001a.

BRAGA, L.L.B.C.; GOMES, M.L.; SILVA, M.W.; FAÇANHA Jr, F.E.; FIUZA, L.; MANN, B.J. Household epidemiology of *Entamoeba histolytica* infection in na urban community in Northeastern Brazil. **American Journal Tropical and Medicine Hygiene**, 65(4), 268-271, 2001b.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention)/ WHO (World Health Organization), 1996. **Epi Info 6, Version 6.04. A Word Processing**,

Database, and Statistics Program for Public Health. Atlanta: CDC/ Geneva: WHO.

CLARK, C.G.; DIAMOND, L.S. *Entamoeba histolytica*: An explanation for the reported conversion of “nonpathogenic” amebae to the “pathogenic” form. **Experimental Parasitology**, 77, 456-460, 1993.

CLARK, C.G.; DIAMOND, L.S. Pathogenicity, virulence and *Entamoeba histolytica*. **Parasitology Today**, 10 (2), 1994.

DACAL, A.R.C.; PEDROSA, C.M.S.; DIAS, G.S. et al. Prevalência de parasitas intestinais em favelados de Maceió. In: **XX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Salvador, BA, 1984.

DELIALIOGLU, N.; ASLAN, G.; SOZEN, M.; BABUR, C.; KANIK, A.; EMEKDOS, G. Detection of *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* in stool specimens by using Enzyme-linked Immunosorbent Assay. **Mem. do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 99 (7), 769-772, Nov., 2004.

DiMICIELI, L. Distinguishing between pathogenic and non-pathogenic species of *Entamoeba*. **Lab Med**, 35 (10), 613-616, 2004.

DOGANCI, L.; TANNYUKSEL, M.; DOGANCI, T. Accurate diagnosis is essential for amebiasis. **World Journal Gastroenterology**, 1231,10(8), 2004.

ESPINOSA-CANTELLANO, M.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, Apr. 318-331, 2000.

EVANGELOPOULOS, A.; LEGAKIS, N.; VAKALIS, N. Microscopy, PCR and ELISA applied to the epidemiology of amoebiasis in Greece. **Parasitology International**, 50(3), 185-189, 2001.

FONTE, L.; MONTALVO, A.M.; ALBERTI, E.; NÚÑEZ, FIDEL; ROJAS, L. Overdiagnosis of intestinal amoebiasis associated to serial microscopical examination of faeces. Some precisions on a problem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 93 (6), 799-800, Nov/Dec., 1998.

FONTES, G.; OLIVEIRA, K.K.L.; OLIVEIRA, A.K.L.; ROCHA, E.M.M. Influência do tratamento específico na prevalência de enteroparasitoses e esquistossomose mansônica em escolares do município de Barra de Santo Antônio, AL. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36 (5), 625-628, set-out, 2003.

GALINDO, L.F.; FERNÁNDEZ, F.N.; MONTALVO, A.M.; RIVERO, L.R.; RODRIGUEZ, M.G.; GAVITO, D.G.; HERNANDEZ, M.E.H. et al. Validación en ciudad de La Habana, Cuba, de *ENZYMEBA*[®], inmunoensayo para la

detección de *Entamoeba histolytica* en heces. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, 50 (1), 18-21, 1998a.

GALINDO, L.F.; FERNÁNDEZ, F.N.; MONTALVO, A.M.; RIVERO, L.R.; AMADOR, A. E. *ENZYMEDIA*, Procedimiento eficaz para estudiar la prevalência de infección intestinal por *Entamoeba histolytica*. **Revista Cubana de Higiene e Epidemiologia**, 36 (2), 131-136, 1998b.

GALINDO, L.F. **Amebiasis: enfoques actuales sobre su diagnóstico, tratamiento y control**. Ciudad de La Habana: Editorial Elfos Scientiae, 2000.

GILCHRIST, C.A.; PETRI, W.A. Virulence factors of *Entamoeba histolytica* . **Current Opinion in Microbiology**, 2, 433-437, 1999.

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**, 237-241, jan.2003.

GONZÁLEZ-RUIZ, A.; HAQUE, R.; AGUIRRE, A.; CASTAÑÓN, G.; HALL, A.; GUHL, F.; RUIZ-PALACIOS, G. *et al.* Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica* . **Journal Clinical Pathology**, 47, 236-239, 1994.

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 (10), 2558-2561, 1995.

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

_____ 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 (2), 449-452, 1998.

_____ ALI, M.; T; PETRI, W.A. Prevalence and Immune Response to *Entamoeba histolytica* in Preschool Children in Bangladesh. **American Journal Medical of Medicine and Hygiene**, 60 (6), 1031-1034, 1999.

_____ MOLLAH, N.U.; ALI, I.K.M.; ALAM, K.; EUBANKS, A.; LYERLY, D.; PETRI, Jr, W.A. Diagnosis of Amebic Liver Abscess and Intestinal Infection with the TechLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests . **Journal of Clinical Microbiology**, 38 (9), 3235-3239, 2000.

_____ MONDAL, D.; KIRKPATRICK, B.D et al. Epidemiologic and clinical characteristics of acute diarrhea with emphasis on *Entamoeba histolytica*

- infections in preschool children in an urban slum of Dhaka, Bangladesh. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. 69(4), 398-405, 2003.
- HUSTON, C.D.; PETRI, W.A. Amebiasis: Clinical Implications of the recognition of *Entamoeba dispar*. **Current Infections Disease Reports**, 1, 441-447, 1999a
- HUSTON, C.D.; HAQUE, R.; PETRI, W.A. Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, (99)00059-9a.pdf, march 1999b.
- KEBEDE, A.; VERWEIJ, J.J.; PETROS, B.; POLDERMAN, A.M. Misleading microscopy in amoebiasis. **Tropical Medicine and International Health**, 9 (5), 651-652, 2004.
- TCTP-JIKA/LIKA-UFPE. **VI Curso Internacional de Doenças Tropicais**, ACA, I.; BOTELHO, S.; KOBAYASHI, S. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2001.
- LUACES, A.L; PICO, T.; BARRETT, A.J. The *ENZYMEDIA* test: detection of intestinal *Entamoeba histolytica* infection by immuno-enzymatic detection of histolysain. **Parasitology**, 105(2), 203-205, Oct. 1992.
- LUCAS, R.; UPCROFT, J.A. Clinical significance of the redefinition of the agent of amoebiasis. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, 43 (4), 183-187, Oct-Dec, 2001.
- MARTÍNEZ-PALOMO, A.; ESPINOSA-CANTELLANO, M. Amoebiasis: New Understanding and New Goals. **Parasitology Today**, 14 (1), 1998.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Saneamento em Maceió. Disponível em: http://tabnet.datasus.gov.br/tabdata/cadernos/AL/AL_Maceio_Geral.xls. Acesso em: 21/08/2006
- 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 dispar* and *E. dispar*. **Journal of Clinical Microbiology**, 35 (9), 2405-2407, Sept. 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 the National Medical Association**, 96 (5), 2004
- NOZAKI, T.; ACA, I.S.; OKUZAWA, E.; MAGALHÃES, M.; TATENO, S.; TAKEUCHI, T. Zymodemes of *Entamoeba histolytica* isolated in the Amazon and the Northeast of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 84, 387-388, 1990.

NOZAKI, T. Current problems of amebiasis in Japan and recent advances in amebiasis research. **Journal of Infectious Diseases**, 53, 229-237, 2000.

NÚÑEZ, Y.O.; FERNÁNDEZ, M.A.; TORRES-NÚÑEZ, D.; SILVA, J.A.; MONTANO, I.; MAESTRE, J.L.; FONTE, L. Multiplex Polymerase Chain Reaction amplification and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* DNA from stool samples. **American Journal Tropical and Medicine Hygiene**, 64(5,6) , 293-297, 2001.

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

PETRI, Jr, W.A.; HAQUE, R.; LYERLY, D.; VINES, R.R. Estimating the impact of amebiasis on health. **Parasitology Today**, 16 (8), 2000.

PETRI, W.A. *et al.* Revisiting amebiasis. **Trends in Parasitology**, 17 (2), Feb, 2001.

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

PINHEIRO, S.M.B.; CARNEIRO, R.M.; ACA, I.S. *et al.* Determination of the prevalence of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in the Pernambuco state of Northeastern Brazil by a Polymerase Chain Reaction. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, 70 (2), 221-224, 2004.

PÓVOA, M.M.; ARRUDA, J.E.G.; SILVA, M.C.M.S. *et al.* Diagnóstico de amebíase intestinal utilizando métodos coproscópicos e imunológicos em amostra da população de Belém, Pará, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 16(3), 843-846, 2000.

PNUD (Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento). **Atlas de Desenvolvimento Humano**. Disponível em: <http://www.pnud.org.br/>. Acesso em 22/08/2006.

RAMOS, F.; MÓRAN, P.; GONZÁLEZ, E.; GARCIA, G.; RAMIRO, M.; GÓMEZ, A.; LÉON, M.C.G.; MELENDRO, E.I. *et al.* High prevalence rate of *Entamoeba histolytica* asymptomatic infection in a rural Mexican community. **American Journal Tropical and Medicine Hygiene**, 73(1) , 87-91, 2005.

RIBEIRO, M.C.L.; GAGLIARDI, S.M.B.; SANTOS, S.R.P.; VILLELA, M.S.H. Pesquisa de *Entamoeba histolytica* em 27 casos positivos para o complexo *E. histolytica/E. dispar*. In: **53ª Reunião Anual da SBPC**, Salvador, 2001

RIVERA, W. L.; TACHIBANA, H.; KANBARA, H. Field study on the distribution of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in the Northern Philippines as

detected by the polymerase chain reaction. **American Journal Tropical and Medicine Hygiene**, 59(6), 916-921, 1998.

SÁNCHEZ-GUILLÉN, M.C.; PÉREZ-FUENTES, R.; SALGADO-ROSAS, H.; RUIZ-ARGUELLES, A.; ACKERS, J.; SHIRE, A.; TALAMÁS-ROHANA, P. Differentiation of *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* by PCR and their correlation with humoral and cellular immunity in individuals with clinical variants of amoebiasis. **American Journal Tropical and Medicine Hygiene**, 66 (60), 731-737, 2002.

SANTOS, C.D. **Anemia, retardo do crescimento e enteroparasitoses em escolares da rede pública de Maceió, Alagoas**. 2001. 105 f. Dissertação (Mestrado do Instituto Materno Infantil de Pernambuco), Recife, 2001.

SARGEAUNT, P.G.; WILLIAMS, J.E.; GRENE, J.D. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 72 (5), 519-521. 1978.

SILVA, E.F.; GOMES, M.A. Amebíase. *Entamoeba histolytica*/ *Entamoeba díspar*. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; GENARO, O. **Parasitologia Humana**. 10ª ed. São Paulo: Ed Atheneu, 2000.

SILVA, L.O.L.; CARVALHO, K.R.A.; SILVA, E. F; GOMES, C.F.L. Diferenciação de *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* em indivíduos de Governador Valadares –MG. In: **Anais do XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia**, Porto alegre, RS, 2005.

SILVA, M.C.M; MONTEIRO, C.S.P.; ARAÚJO, B.A.V.; SILVA, J.V.; PÓVOA, 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. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 21 (3), 969-973, 2005.

TACHIBANA, H.; KOBAYASHI, S.; PAZ, K.C.; ACA, I.S.; TATENO, S.; IHARA, S. Analysis of pathogenicity by restriction-endonuclease digestion of amplified genomic DNA of *Entamoeba histolytica* isolated in Pernambuco, Brazil. **Parasitology Research**, 78, 433-436, 1992.

TANYUKSEL, M.; PETRI, W.A. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, 16 (4), 713-729, Oct. 2003.

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

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

TROLL, H.; MARTI, H.; WEISS, N. Simple Differential of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fresh stool specimens by sodium acetate-acetic acid-formalin concentration and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, 35 (7), 1701-1705, Jul. 1997

VERWEIJ, J.J.; OOSTVOGEL, F.; BRIENEN, E.A.T. et al. Prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in northern Ghana. **Tropical Medicine and International Health**, 8 (12), p. 1153-1156, 2003.

WALSH, J. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. **Reviews of Infectious Diseases**, (8), 2. March-April, 1986.

WALSH, J. Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. In: Ravdin J.I., Guerrant R.L., Walsh J.A. (eds). **Human Infection by Entamoeba histolytica**, New York, John Wiley, 1988.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly Epidemiological Record**. Geneva, nº 14, 1997.

_____. News and activities. *Entamoeba* taxonomy. Bulletin 75 (3): 201-292, 1997b.

ZAKI, M.; CLARK C.G. Isolation and characterization of polymorphic DNA from *Entamoeba histolytica* . **Journal of Clinical Microbiology**, 39(3), 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(4), 1271-1276, 2002.



Apêndice



APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da pesquisa: Prevalência da *Entamoeba histolytica* em estudantes das escolas públicas da cidade de Maceió

Pesquisador responsável: Iasmin de Albuquerque Cavalcanti Duarte

Eu, abaixo assinado, responsável pelo menor

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

Fui esclarecido sobre as perguntas que serão feitas através de um questionário, como também sobre a coleta de fezes para realização de exames no laboratório. Estou ciente de que serão doados os potes para coleta das fezes e que não terei nenhuma despesa com os exames a serem realizados.

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

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

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

Maceió, ____/____/____

Assinatura do responsável

Assinatura do pesquisador

APÊNDICE 2

QUESTIONÁRIO PREVALÊNCIA DA *E.histolytica* EM ESTUDANTES DAS ESCOLAS PÚBLICAS NA CIDADE DE MACEIÓ

Identificação:

Questionário nº (_____)

Nome da criança _____

Sexo: Masculino (1) Feminino (2)

Data do nascimento ____/____/____

Escola _____

Endereço _____

1. A água da casa usada para beber é
da rede pública?

Sim (1)

Não (2)

2. Tem água encanada em casa?

Sim (1)

Não (2)

3. Tem sanitário na casa?

Sim (1)

Não (2)

4. Qual o destino dos dejetos?

Fossa (1)

A céu aberto (2)

5. Como são as paredes da casa?

De tijolo (1)

De taipa (2)

De lona ou papelão (3)

6. Viajou ou chegou de algum estado
nos últimos 6 meses?

Sim (1)

Não (2)

Qual estado? _____



Anexo



ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Maceió-AL, 12/12/2002



Senhor(a) Pesquisador(a) :

O Comitê de Ética na Pesquisa (CEP), reunido em 12/12/2002 e com base no parecer emitido pelo(a) relator(a) do processo nº 009057/02-95, sob o título PREVALÊNCIA DA ENTAMOEBASE HISTOLYTICA EM ESTUDANTES DAS ESCOLAS PÚBLICAS DE MACEIÓ., de sua autoria, vem por este instrumento comunicar sua aprovação, com base no item VIII.13,b, da Resolução nº 196/96.

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

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

(*) Áreas temáticas especiais.