

Diferenciação entre *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* por meio de ensaio imunoenzimático para pesquisa de antígenos em amostras fecais

Differentiation between *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by means of immunoenzymatic assay for antigens detection in children fecal samples

RIALA6/1144

Juliane B. S. TOMÉ^{1*}, Rejane G. TAVARES¹

*Endereço para correspondência: Rua Professora Eugênia dos Reis Perito, 103/301 Bairro Passagem, Tubarão, SC/Brasil CEP: 88705-370. E-mail: jbstome@hotmail.com Telefone: (48) 9109-1783

¹Curso de Biomedicina do Centro Universitário Feevale, Instituto de Ciências da Saúde, Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, RS/Brasil. Laboratório de Biomedicina, Setor de Parasitologia, Centro Universitário Feevale
Recebido: 11/06/2007 – Aceito para publicação: 06/12/2007

RESUMO

A diferenciação do agente patogênico causador de amebíase obteve grande importância desde que *Entamoeba histolytica* (patogênica) foi considerada como espécie distinta de *Entamoeba dispar* (não patogênica). No presente estudo, foi realizada a pesquisa de antígenos de *E. histolytica* em amostras fecais de crianças residentes na cidade de São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil, utilizando-se ensaio imunoenzimático, ELISA (*E. histolytica* Test, TechLab Inc., Blacksburg, EUA) disponível no comércio. Foram analisadas 262 amostras de fezes pela técnica de Hoffman, Pons e Janer (HPJ), em que três amostras apresentaram positividade para o complexo *E. histolytica*/*E. dispar*. Do total de amostras, 91 (incluindo aquelas positivas pela técnica de HPJ) foram analisadas por meio de ELISA. Houve discordância entre os resultados obtidos no exame coproparasitológico e no ELISA, pois todas amostras foram não reagentes no ELISA. Estes dados indicam a presença de *E. dispar* e ausência de *E. histolytica* nas três amostras positivas pela técnica de HPJ. Os dados do presente estudo mostram a importância de utilização de técnica mais específica para efetuar identificação e diferenciação da amebíase intestinal.

Palavras-chave. *Entamoeba histolytica*, amebíase, ELISA, coproantígeno.

ABSTRACT

The differentiation of the pathogen that cause amebiasis has turned to be relevant since *Entamoeba histolytica* (pathogenic) has been considered as a distinct species from *Entamoeba dispar* (non-pathogenic). In the present study *E. histolytica* antigens were investigated in stool samples from children of São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brazil, by means of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA (*E. histolytica* Test, TechLab Inc., Blacksburg, USA). A total of 262 fecal samples were analyzed by Hoffman, Pons and Janer method, and three samples showed positive result for *E. histolytica*/*E. dispar* complex. Of 262 samples, 91 (including those positive on Hoffman, Pons and Janer method) were analyzed by ELISA. The discrepancy of results on coproparasitologic exam and on ELISA was detected as all fecal samples were negative on ELISA, indicating the presence of *E. dispar* but not of *E. Histolytica* in those three positive samples on HPJ technique. These data point out the relevance in employing a highly specific technique for performing the identification and differentiation of intestinal amebiasis.

Key words. *Entamoeba histolytic*, amebiasis, ELISA, coproantigen.

INTRODUÇÃO

A amebíase é uma infecção causada pelo protozoário *Entamoeba histolytica*, e se adquire por meio da ingestão de cistos presentes em alimentos ou água contaminados por matéria fecal. Esta doença apresenta distribuição mundial, tendo uma prevalência elevada em regiões tropicais e subtropicais, principalmente em comunidades que vivem em condições sanitárias inadequadas^{1,2,3}. No Brasil, estudos epidemiológicos têm demonstrado que os índices de prevalência variam de acordo com a região e a população estudada⁴.

O método de Hoffman, Pons e Janer⁵, que se baseia na sedimentação espontânea, ainda é o método de escolha para identificação de parasitoses intestinais, porém não permite a diferenciação entre *E. histolytica*, patogênica e invasiva, da *E. dispar* considerada espécie não patogênica, visto que ambas são morfológicamente idênticas⁶. Por isso a Organização Mundial da Saúde recomenda que, depois de identificado microscopicamente o complexo *E. histolytica/E. dispar*, seja feita a diferenciação por testes mais específicos⁷, como o imunoensaio enzimático (ELISA), que detecta antígenos específicos para *E. histolytica*^{1,3,6,8}, ou testes de biologia molecular⁹, ambos com boa sensibilidade e especificidade¹⁰. O objetivo deste estudo foi diferenciar *Entamoeba histolytica* de *Entamoeba dispar* por meio da detecção de coproantígenos de *Entamoeba histolytica* em uma amostra da população de São Leopoldo, Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra, Coleta e Análise Parasitológica

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro Universitário Feevale, processo número 2.13.03.06.475. Foram coletadas 262 amostras de fezes de crianças na faixa etária de 2 a 12 anos em três Escolas Municipais de Educação Infantil e em duas Entidades Assistenciais de São Leopoldo, RS. As amostras foram espontaneamente emitidas em frascos adequados, e em seguida processadas no Laboratório de Biomedicina pelo método de Hoffman, Pons e Janer (HPJ). De cada amostra foram confeccionadas três lâminas, coradas com lugol para análise microscópica (100x e 400x). Para a realização do método de ELISA, alíquotas das mesmas amostras foram congeladas a -20°C, e a validação do método foi realizada através de controles comerciais negativo e positivo fornecidos juntamente com o *kit*. O método de ELISA foi realizado seguindo as instruções do fabricante do *kit Entamoeba histolytica* II (00265), TechLab®. Neste método foram utilizadas somente 91 amostras aleatórias, previamente analisadas pelo método HPJ, sendo três positivas para o complexo *E. histolytica/E. dispar*, 84

positivas para alguma espécie de parasita e quatro amostras negativas, além do controle negativo e controle positivo do *kit*. A leitura foi realizada visualmente, onde a amostra negativa deve ser semelhante ao controle negativo, ou seja, apresentar ausência de cor ou ligeiramente amarelado. Já as amostras positivas devem ser semelhantes ao controle positivo, ou seja, apresentarem coloração mais amarela que a cavidade controle negativo.

RESULTADOS

Das 262 amostras analisadas pelo método HPJ, 62,21% (163) resultaram negativas para enteroparasitas e 37,79% (99) positivas. Das amostras positivas, três apresentaram o complexo *E. histolytica/E. dispar*. Na Tabela 1 estão citados a frequência de parasitas encontrados, ressaltando-se que estão incluídas também crianças poliparasitadas. Foi também realizada a análise macroscópica das fezes, sendo que não foram observadas amostras diarreicas.

Tabela 1. Frequência de parasitas encontrados nas 99 amostras fecais positivas, analisadas pelo método de Hoffman, Pons e Janer (HPJ).

Parasitos	Frequência
<i>Endolimax nana</i>	42
<i>Giardia lamblia</i>	36
<i>Entamoeba coli</i>	29
<i>Ascaris lumbricoides</i>	14
<i>Trichuris trichiura</i>	8
Complexo <i>E.histolytica/E.dispar</i>	3
<i>Strongyloides stercoralis</i>	3
<i>Hymenolepis nana</i>	1
<i>Enterobius vermiculares</i>	1
Total	137

Tabela 2. Resultado das 91 amostras testadas pelo método de ELISA (*E. histolytica* Test, TechLab Inc.) para detecção de *Entamoeba histolytica*, em comparação com o método de Hoffman, Pons e Janer (HPJ).

HPJ	ELISA		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	0	3	3
Negativo	0	88	88
Total	0	91	91

Quando 91 amostras analisadas pelo método HPJ, incluindo as três amostras positivas para o complexo *E. histolytica/E. dispar*, foram analisadas pelo método de ELISA, houve uma negatividade de 100% no teste de ELISA para a presença do protozoário *E. histolytica* (Tabela 2).

DISCUSSÃO

A ocorrência de parasitoses, principalmente em crianças, é um importante problema de saúde pública. Para o seu diagnóstico, o método clássico é a utilização de métodos de sedimentação, mais comumente o método de Hoffman, Pons e Janer. Este método, apesar de economicamente mais viável, não é capaz de diferenciar o complexo *E. histolytica/E. dispar*, já que estas são morfológicamente idênticas⁶. Para isto, sugere-se o uso de técnicas específicas como, por exemplo, a técnica de imunensaio enzimático (ELISA) ou biologia molecular. Entretanto, em nosso meio, estes métodos não são rotineiramente utilizados, seja por divulgação ineficiente da técnica ou por questões econômicas.

Nas 91 amostras analisadas pelo método ELISA para o diagnóstico do patógeno *E. histolytica*, três apresentaram-se positivas na análise microscópica, porém, quando analisadas pelo método enzimático revelaram-se negativas. Pode-se sugerir que o diagnóstico adequado destas amostras é a presença de *E. dispar*, protozoário não patogênico.

É interessante avaliar que em nenhuma das amostras houve a ocorrência isolada do complexo *E. histolytica/E. dispar*. Este sempre ocorreu em crianças poliparasitadas, simultaneamente com a presença do protozoário *E. coli*, pertencente à mesma família e também com semelhanças morfológicas, diferenciando-se principalmente pelo número de núcleos. Embora as amostras tenham sido avaliadas por três observadores independentes, este fato poderia ser motivado por dificuldades de identificação adequada na análise microscópica. Este fato também poderia ter sido minimizado com o uso de coloração mais específica como, por exemplo, hematoxilina férrica ou tricrômica, já que a coloração com lugol não fornece detalhamento morfológico para o diagnóstico.

Não foi identificada a presença de trofozoítos, já que esta forma parasitária é mais comumente observada em fezes diarréicas, e todas as amostras examinadas apresentavam consistência sólida.

Os nossos resultados estão de acordo com estudos prévios, que demonstram que o Rio Grande do Sul apresenta baixos índices de ocorrência de amebíase¹¹. Entretanto, levando-se em consideração a morbi-mortalidade desta patogenicidade, e de acordo com a orientação da OMS, que estabelece a necessidade de diagnóstico efetivo para que se efetue o tratamento da

amebíase⁷, é de extrema importância a validação de um método diagnóstico mais específico, embora com custo efetivo mais elevado, que possa ser utilizado conjuntamente ao exame parasitológico de fezes, oferecendo maior confiabilidade ao diagnóstico da infecção.

REFERÊNCIAS

1. Braga LLBC, Gomes ML, Silva MW, Paiva C, Sales A, Mann BJ. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections as detected by monoclonal antibody in an urban slum in Fortaleza, Northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34 (Suppl 5): 467-71.
2. Cimerman B, Cimerman S. *Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais* 2nd ed. São Paulo: Ed. Atheneu; 2001.
3. Delialioglu N, Aslan G, Sozen M, Babur C, Kanik A, Emekdas G. Detection of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* in stool specimens by using enzyme-linked immunosorbent assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99 (Suppl 7): 769-72.
4. Maciel A, Dourado A, Aca IS. Ocorrência de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* em pacientes ambulatoriais de Recife, PE. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39 (Suppl 4): 388-9.
5. Wiebbeling AMP, Santos DE, Mezzari A. Parasitas intestinais: aspectos gerais e prevalência em um escola da periferia de Porto Alegre – RS. *News lab* 2003; 60: 118-34.
6. Redondo RB, Méndez LGM, Baer G. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differentiation by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its clinical correlation in pediatric patients. *Parasitologia Latinoamericana* 2006; 61: 37-42.
7. World Health Organization. *Entamoeba* taxonomy. *Bull WHO* 1997; 75 (Suppl 3): 291-2.
8. Abd-Alla MD, Ravdin JI. Diagnosis of amoebic colitis by antigen capture ELISA in patients presenting acute diarrhea in Cairo, Egypt. *Trop Med Intern Health* 2002; 7: 365-70.
9. Zaki M, Meelu P, Sun W, Clark CG. Simultaneous differentiation and typing of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *J Clin Microbiol* 2002; 40 (Suppl 4): 1271-6.
10. Uecker M, Copetti CE, Polize L, Flores V. Infecções parasitárias: diagnóstico imunológico de enteroparasitoses. *RBAC* 2007; 31 (Suppl 1): 15-19.
11. Nozaki T, Aca IS, Okuzana E, Magalhães M, Tateno S, Takeuchi T. Zymodemes of *Entamoeba histolytica*, isolated in Amazon and the Northeast Regions of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84: 387-8.