

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF**

**FERNANDA DA COSTA BRASIL**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PROTOZOÁRIOS ENTÉRICOS EM EQUINOS  
COM POSSÍVEL POTENCIAL ZONÓTICO**

**Campos dos Goytacazes**

**2015**

**FERNANDA DA COSTA BRASIL**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PROTOZOÁRIOS ENTÉRICOS EM EQUINOS  
COM POSSÍVEL POTENCIAL ZONÓTICO**

**Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense-Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a conclusão do Curso de Mestrado em Ciência Animal.**

**Orientador: Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira**

**Campos dos Goytacazes**

**2015**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 198/2015

Brasil, Fernanda da Costa

Diagnóstico molecular de protozoários entéricos em equinos com possível potencial zoonótico / Fernanda da Costa Brasil. – 2015.  
83 f. : il.

Orientador: Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira.  
Dissertação (Mestrado - Ciência Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2015.  
Bibliografia: f. 67 – 82.

1. Equino 2. Diarreia 3. Microrganismos 4. Veiculação hídrica 5. PCR I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD– 636.1089

**FERNANDA DA COSTA BRASIL**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PROTOZOÁRIOS ENTÉRICOS EM EQUINOS  
COM POSSÍVEL POTENCIAL ZONÓTICO**

**Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense-Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na Área de concentração em Sanidade Animal.**

**Aprovado em 31 de Julho de 2015.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Nicole Brand Ederli – UFPA**

---

**Dr. Edwards Frazão-Teixeira – FIOCRUZ**

---

**Prof. Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos - UENF**

---

**Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira – UENF  
(Professor Orientador)**

## AGRADECIMENTOS

O meu agradecimento especial a Deus! Obrigado senhor, por estar sempre presente, me confortando nos momentos difíceis, dando-me esperança e força para continuar sempre.

Aos meus pais Garibalde Brasil (*in memoriam*) e Ana Maria da Costa Brasil, pelo incentivo e amor durante a minha caminhada e aos meus irmãos Felipe da Costa Brasil e Fabiana da Costa Brasil pelo apoio e força que deles sempre recebi.

À minha família, pelo amor e apoio incessante. Ao meu eterno e único amor, minha filha Maria Fernanda de Almeida Brasil: motivação maior de meus esforços.

Ao meu orientador, Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira pelo exemplo de dedicação, por mais essa oportunidade e por seguir sempre acreditando mais que eu na minha capacidade.

Ao grupo de trabalho do NUPAP - Núcleo de Pesquisas Avançadas em Parasitologia do Hospital Veterinário da UENF, em especial ao meu amigo Inácio Silva Viana, pela amizade, pelo estreito convívio e a todos que direta ou indiretamente me auxiliaram nesta jornada, que além da contribuição no meu aprendizado, fizeram os dias no setor mais agradáveis. A todos vocês, meu muito obrigada!

Um agradecimento a minhas amigas de luta e glórias July Narváes e Aline Matos Arrais, por estarem sempre ao meu lado, mesmo que distantes e por me ajudarem a tornar mais leve o fardo das escolhas e consequências da vida.

Um agradecimento especial à doutoranda Samira Salim Mello Gallo, pelo apoio, pela competência, ética e caráter, pelos ensinamentos, paciência e orientação e acima de tudo pela confiança, preocupação e amizade dispensadas a mim.

*Nenhuma sociedade se afirma sem o aprimoramento de sua cultura, da ciência, da  
pesquisa, da tecnologia, do ensino.*  
*Paulo Freire.*

## RESUMO

BRASIL, F.C. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Julho de 2015; Diagnóstico molecular de protozoários entéricos em equinos com possível potencial zoonótico. Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira.

É notável o avanço da medicina no diagnóstico e tratamento das doenças infectocontagiosas e parasitárias nas últimas décadas. No entanto, algumas dessas doenças continuam responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, principalmente àquelas causadas pelos agentes patogênicos considerados emergentes e reemergentes. As parasitoses emergentes como a criptosporidiose e microsporidiose e as reemergentes como as amebíase e giardíase, podem ser incluídas em um grupo de parasitoses de veiculação hídrica causadoras de diarreias, podendo ser veiculadas por animais domésticos em geral e em específico neste trabalho pelos equinos. O objetivo deste trabalho foi determinar o “status” sanitário de equinos, criados na periferia do município de Campos dos Goytacazes – RJ, em relação aos principais patógenos entéricos e o possível risco aos tratadores e pessoas que convivem com esses animais, através do isolamento e diagnóstico molecular pela PCR (Reação em cadeia da polimerase). Foram selecionadas 3 propriedades denominadas FAMILIAR, JOCKEY e HARAS, classificadas de acordo com tipo de criação, localização e infraestrutura e foi feita análise molecular pela PCR. Dos 50 animais examinados 22 estavam positivos para patógenos entéricos determinando uma frequência de 44%, no entanto, em um animal da JOQUEI foi detectado o DNA de *Giardia* spp., o que equivale a uma frequência de 02%. Também foram diagnosticados, pela mesma técnica, dois animais positivos para *Cryptosporidium* spp., frequência de 4%, ambos da propriedade FAMILIAR e 19 animais infectados por *Entamoeba* spp., frequência de 38%, onde destes, oito são da FAMILIAR, nove da JOCKEY e dois da HARAS. Foi determinado o Risco relativo da infecção por *Entamoeba* spp. pelos equinos das propriedades FAMILIAR e JOCKEY comparando ao da propriedade HARAS e verificou-se que a propriedade FAMILIAR tem cinco vezes mais chance de ter animais infectados ( $P=0,069$  e  $Rr=5,231$ ) do que a propriedade HARAS e que a propriedade JOCKEY tem três vezes mais chance dos animais apresentarem o protozoário nas fezes ( $P=0,365$  e  $Rr= 3,825$ ) do que a propriedade HARAS. Podemos concluir que: Provavelmente os equinos da região de Campos dos Goytacazes – RJ fazem parte da cadeia epidemiológica de patógenos entéricos de possível potencial zoonótico.

Palavras-chave: Equinos, diarreia, microrganismos, veiculação hídrica, PCR

## ABSTRACT

BRASIL, F.C. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; July 2015; Molecular diagnosis of enteric protozoa in horses with possible zoonotic potential. Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira.

Diagnóstico molecular de protozoários entéricos em equinos com possível potencial zoonótico

It is remarkable medical increase in the diagnosis and treatment of infectious and parasitic diseases in recent decades. However, some of these diseases are still responsible for high rates of morbidity and mortality throughout the world, especially those caused by pathogens considered emerging and reemerging. Emerging parasitic diseases such as cryptosporidiosis and microsporidiosis and reemerging as amebiasis and giardiasis can be included in a group of parasitic waterborne causing diarrhea, which may be carried by domestic animals in general and in particular in this work by horses. The objective of this study was to determine the "status" of equine hygiene, created on the outskirts of the city of Campos dos Goytacazes - RJ, on the main emerging and reemerging pathogens and the possible risk to handlers and people who live with these animals, through the isolation and molecular diagnosis by PCR. We selected three properties named FAMILIAR, JOCKEY e HARAS, classified according to type of creation, location and infrastructure and It was made molecular analysis by PCR (polymerase chain reaction). Of 50 animals examined 22 were positive for enteric pathogens determining a frequency of 44%, however, in an animal of JOCKEY was detected DNA of *Giardia* spp., which corresponds to a frequency of 02% were also diagnosed by the same technique, two animals positive for *Cryptosporidium* spp., 4% frequency of FAMILIAR, and 19 animals infected with *Entamoeba* spp., frequency of 38%, where these, eight are the FAMILIAR, nine of JOCKEY and two HARAS. It was determined Rr of infection by *Entamoeba* spp. by horses of FAMILIAR and JOCKEY properties compared to the HARAS property and it was found that the FAMILIAR property has five times more likely to have infected animals ( $P = 0.069$  and  $R f = 5.231$ ) than HARAS property and that the property has three JOCKEY times more likely to submit the animal parasite in the feces ( $P = 0.365$ , and  $RSS = 3.825$ ) than HARAS property. We can conclude that: probably horses in the Campos dos Goytacazes - RJ was part of the epidemiological chain of enteric pathogens as possible zoonotic potential.

Keywords: equines, diarrhea, microorganisms, waterborne, PCR

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Imagem de satélite de uma região do município de Campos dos Goytacazes – RJ onde estão situadas as 3 propriedades selecionadas para estudo.....	<b>50</b>
<b>FIGURA 2</b>	Eletroforese em gel de agarose (1%) com os produtos da nPCR da região SSU dos genes da subunidade rDNA de cistos de <i>Giardia</i> spp.. Marcador de peso molecular (MM); controle positivo (+); controle negativo (-); controle de nested negativo (N) e amostra 56 positiva. A seta indica a posição relativa de um produto de nested PCR de aproximadamente 300 pb.....	<b>55</b>
<b>FIGURA 3</b>	Eletroforese em gel de agarose (1%) com os produtos da nested PCR da região 18S dos genes da subunidade rRNA de oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp.. Marcador de peso molecular (MM); controle positivo (+); controle negativo (-); controle de nested negativo (N) e amostras 19 e 21 positivas. A seta indica a posição relativa de um produto de nested PCR de aproximadamente 800 pb.....	<b>56</b>
<b>FIGURA 4</b>	Eletroforese em gel de agarose (1%) com os produtos da PCR região SSU dos genes da subunidade rRNA de cistos de <i>Entamoeba</i> spp.. Marcador de peso molecular (MM); controle positivo (+); controle negativo (-) e amostras 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 27, 29, 37, 38, 41, 43, 44, 45, 46, 47 e 49 positivas. A seta indica a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 550 pb.....	<b>57</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Diagnóstico de patógenos entéricos emergentes e reemergentes em equinos de propriedades localizadas em áreas urbanas da cidade de Campos dos Goytacazes-RJ, através da técnica da “Polymerase chain Reaction” (PCR) “nested Polymerase Chain Reaction” (n-PCR).....	<b>55</b>
<b>TABELA 2</b>	Distribuição do número de amostras diagnosticadas por propriedades e patógenos entéricos emergentes e reemergentes de equinos criados em áreas urbanas da cidade de Campos dos Goytacazes-RJ, através da técnica da “Polymerase chain Reaction” (PCR) “nested Polymerase Chain Reaction” (n-PCR).....	<b>58</b>
<b>TABELA 3</b>	Frequência de Infecção por <i>Entamoeba</i> spp. em equinos criados na periferia da cidade de Campos dos Goytacazes-RJ de acordo com a idade. Exame de amostras fecais através da técnica da “Polymerase chain Reaction” (PCR).....	<b>58</b>
<b>TABELA 4</b>	Frequências comparativas da infecção por <i>Entamoeba</i> spp. em equinos de três diferentes propriedades da periferia da cidade de Campos dos Goytacazes-RJ. Exame de amostras fecais através da técnica da “Polymerase chain Reaction” (PCR).....	<b>58</b>
<b>TABELA 5</b>	Risco relativo (Rr) da infecção por <i>Entamoeba</i> spp. em equinos de duas diferentes propriedades da periferia da cidade de Campos dos Goytacazes-RJ. Exame de amostras fecais através da técnica da “Polymerase chain Reaction” (PCR).....	<b>59</b>
<b>TABELA 6</b>	Risco relativo (Rr) da infecção por <i>Entamoeba</i> spp. em equinos de duas diferentes propriedades da periferia da cidade de Campos dos Goytacazes-RJ. Exame de amostras fecais através da técnica da “Polymerase Chain Reaction” (PCR).....	<b>59</b>

## LISTA DE SIGLAS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida	Mm – Milímetro
BSA - Bovine serum albumine	MO – Microscopia Óptica
BLAST - Basic Local Alignment Search Tool	µm – Micrômetro
CCTA - Centro de Ciências Tecnológicas Agropecuárias	NUPAP - Núcleo de Pesquisas Avançadas em Parasitologia
CDC – Center of Disease Control and Prevention	ODC – Ornitina descarboxilase
CD4 - Cluster of Differentiation 4,	PAS - Periodic acid-Schiff
Céls – Células	pb - Pares de base
DMSO - Dimetilsufóxido	pH – Potencial Hidrogeniônico
DNA - Deoxyribonucleic acid	PCR - Polymerase Chain Reaction
dNTP - Desoxirribonucleotídeo trifosfato	RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism
ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	RNA - Ribonucleic acid
g - Grama	rDNA – DNA ribossomal
GalNAc - N-acetilgalactosamina	rRNA – RNA ribossomal
H&E – Hematoxilina e Eosina	rpm - Rotações por minuto
HIV – Human Immunodeficiency Virus	RS – Rio grande do Sul
HV – Hospital Veterinário	s – Segundo
HXGPRT - Hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyl transferase	SAEG – Sistema para Análises Estatísticas Gráficas.
IFAT - Indirect Fluorescent Antibody Test	SSU – Small subunit
ITS - Internal Transcribed Spacer	sp. – Espécie
Lipoproteínas A, D, E e K – A (retinol); D (calciferol); E (tocoferol) e K (filoquinona)	spp. – Espécies
LSA - Laboratório de Sanidade Animal	TAA – Terapia animal assistida
min - Minuto	Taq - Thermus aquaticus
Mg – Miligrama	UENF - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
ml – Mililitros	USA - United States of America
	°C – Graus Célsius

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. GERAL.....	14
2.2. ESPECÍFICO.....	14
3. JUSTIFICATIVA.....	15
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
4.1. DESENVOLVIMENTO HUMANO E AS DOENÇAS PARASITÁRIAS..	16
4.2. VEICULAÇÃO DE ZONÓSES POR ANIMAIS DOMÉSTICOS.....	17
4.3 DOENÇAS ENTÉRICAS ZONÓTICAS EM EQUINOS.....	18
4.4 <u>CRYPTOSPORIDIUM SPP.</u> .....	19
4.4.1. <b>Patogenia</b> .....	21
4.4.2. <b>Características Clínicas</b> .....	21
4.4.3. <b>Diagnóstico</b> .....	22
4.5 <u>GIARDIA SPP.</u> .....	24
4.5.1 <b>Patogenia</b> .....	25
4.5.2 <b>Características Clínicas</b> .....	26
4.5.3 <b>Diagnóstico</b> .....	27
4.6. <u>ENTAMOEBA SPP.</u> .....	28
4.6.1 <b>Patogenia</b> .....	32
4.6.2 <b>Características Clínicas</b> .....	34
4.6.3 <b>Diagnóstico</b> .....	36
4.7 BIOLOGIA MOLECULAR.....	46
4.7.1 <b>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</b> .....	46
4.7.1.1 Nested PCR.....	47
4.7.1.2 Multiplex PCR.....	48
4.7.1.3 PCR-RFLP.....	48
4.7.2 <b>Sequenciamento</b> .....	49

<b>5. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
5.1 LOCAL DE EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO.....	49
5.2 ANIMAIS UTILIZADOS.....	50
5.3 ISOLAMENTO DOS PROTOZOÁRIOS A PARTIR DE AMOSTRAS FCAIS.....	50
5.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	51
5.4.1 <b>Extração do DNA</b> .....	<b>51</b>
5.4.2 <b>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</b> .....	<b>52</b>
5.4.2.1 <i>Cryptosporidium</i> spp.....	52
5.4.2.2 <i>Giardia</i> spp.....	52
5.4.2.3 <i>Entamoeba</i> spp.....	53
5.4.3 <b>Eletroforese em gel de agarose</b> .....	<b>53</b>
5.5 ESTATÍSTICA.....	53
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>

## 1. INTRODUÇÃO

É notável o avanço da medicina no diagnóstico e tratamento das doenças infectocontagiosas e parasitárias nas últimas décadas. Estudos epidemiológicos vêm contribuindo, também para o controle e prevenção das mesmas. No entanto, algumas dessas doenças continuam responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, principalmente àquelas causadas pelos agentes patogênicos considerados emergentes e reemergentes.

Doenças emergentes são definidas como aquelas em que é observada uma grande incidência de um agente infeccioso até então desconhecido, ou que o número de casos relatados nos últimos anos tenha aumentado significativamente em seres humanos e animais. Já as doenças reemergentes são aquelas já conhecidas que estão reaparecendo após um declínio significativo em seus casos de incidência e que passam novamente a representar um risco à saúde humana e animal.

As alterações climáticas também são determinantes para o aumento da incidência dessas doenças onde o homem é diretamente responsável, através de atividades industriais e queima de combustíveis fósseis, aumentando a concentração de dióxido de carbono atmosférico com emissão de novos gases, entre outros. Aumento da temperatura, radiação solar, precipitação e umidade contribuem para modificações na estabilidade da natureza dos vetores. Além disso, temperaturas mais elevadas predisõem, a episódios mais intensos de chuvas, permitindo que parasitas de veiculação hídrica possam se disseminar com mais facilidade do que normalmente não ocorreria. Entre as parasitoses de veiculação hídrica podemos citar a criptosporidiose, a amebíase e a giardíase.

Tais doenças, classificadas no passado como negligenciadas, não teriam seu potencial de infecção tão exacerbado, se não fosse à emergência de doenças como a AIDS e o câncer além de procedimentos como transplantes cada dia mais comuns, que possuem a imunossupressão como característica que eleva a importância de se observar sinais clínicos que no passado trariam um “status” de morbidade, mas que hoje são responsáveis por significantes taxas de mortalidade.

Uma das causas apontadas como responsáveis pelo aumento do número de casos dessas doenças é o próprio desenvolvimento humano, que muitas vezes mantém

ou cria condições de transmissão, ao invés de evitar a sua propagação. Alterações do meio-ambiente e do ecossistema visando modernização, tais como desmatamento para construção de estradas e desenvolvimento comercial (especialmente pecuária e agricultura), habitação e mudança de hábitos com intensa aproximação de animais domésticos, produzem impacto significativo no ciclo de muitas dessas doenças, podendo propiciar a disseminação desses agentes considerados emergentes e reemergentes.

Os animais domésticos podem transmitir ao homem numerosos parasitas capazes de provocar doenças, as chamadas zoonoses. Dentre os animais domésticos que são uma fonte de infecções e infestações humanas, o cão tem um lugar de grande importância, sendo responsável pela transmissão da raiva, leptospirose, larva migrans além de infecção por cestoda; os gatos são transmissores de toxoplasmose e helmintíases. Os bovinos possuem sua importância na transmissão da tuberculose, brucelose e encefalopatia espongiiforme bovina; os suínos são os responsáveis pela transmissão de teníase além da leptospirose; os equinos contribuem neste conjunto com a transmissão do mormo e tétano; os roedores com a peste bubônica, tifo e o estreptobacilo moniliforme; os pássaros transmitem a ornitose; e todos os animais criados em proximidade com o homem podem ser importantes disseminadores de zoonoses em geral, contribuindo nas passagens pelo hospedeiro e transferência deste.

Os equinos podem desempenhar um papel importante na cadeia epidemiológica de várias dessas doenças citadas acima, visto o seu estreito relacionamento com o ser humano, além de poderem estar infectados sem, no entanto, apresentarem sinais clínicos das doenças ou ainda serem considerados reservatórios capazes de contaminar o ambiente onde vivem.

As parasitoses incluídas no grupo de parasitoses de veiculação hídrica causadoras de diarreias podem ser veiculadas por animais domésticos em geral e em específico neste trabalho pelos equinos, apresentando sintomas clínicos ou não, principalmente no compartilhamento das águas de beber e de lavagem e a possível contaminação entre fossas e poços artesianos.

Com relação ao diagnóstico, apesar de alguns destes parasitos poderem ser identificados por técnicas convencionais em microscopia óptica e testes laboratoriais como o ELISA, a identificação correta e segura da espécie para se classificar como sendo zoonótica, só pode ser confirmada através de estudos moleculares, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida de sequenciamento ou

Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP), devido à grande semelhança morfológica existente entre espécies. Além disso, as técnicas moleculares são comprovadamente mais sensíveis que às de microscopia e ELISA, o que minimiza, portanto, as chances de ocorrência de resultados falso-negativos em amostras com pouca quantidade de cistos e oocistos.

Em pesquisas que realizam análise molecular apenas de amostras previamente consideradas como positivas em microscopia, corre ainda o risco de condicionar os resultados a espécies e genótipos que produzem elevada quantidade de cistos e oocistos. Portanto, para a obtenção de resultados fidedignos e confiáveis, é essencial o emprego de uma análise molecular em todas as amostras utilizadas em diagnósticos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Determinar o “status” sanitário de equinos, criados na periferia do município de Campos dos Goytacazes, RJ em relação aos principais protozoários de veiculação hídrica e o possível risco aos tratadores e pessoas que convivem com esses animais.

### 2.2 ESPECÍFICO

- Detectar e identificar a presença de material genômico de espécies de protozoários com potencial risco à saúde pública, principalmente os do grupo dos causadores de diarreia como *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba* spp. e *Giardia* spp em fezes de equinos, através do isolamento e diagnóstico molecular pela PCR.

### 3 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que o oferecimento de uma água potável de qualidade em rede para toda população ainda é um problema a ser resolvido e que por esse motivo, uma grande parte da população ainda utiliza fontes de água alternativas como às de minas, poços comuns ou ainda águas de subsolo, oriundas de poços artesianos, sem tratamento, que podem estar contaminadas por dejetos fecais eliminados pelos animais domésticos e silvestres ou do próprio homem.

Atualmente, existe uma escassez de dados baseados em biologia molecular de parasitas no Brasil, uma vez que a maioria das pesquisas ainda é realizada apenas por técnicas baseadas em microscopia. Apesar de alguns protozoários poderem ser identificados por técnicas convencionais em microscopia óptica, a identificação correta e segura da espécie só poderá ser confirmada através de estudos moleculares, tais como a PCR seguida de sequenciamento ou RFLP, devido à grande semelhança morfológica existente entre gêneros diferentes, em um mesmo gênero ou ainda entre espécies e cepas ou genótipos dentro de uma mesma espécie. Além disso, as técnicas moleculares são comprovadamente mais sensíveis que as de microscopia em amostras com pouca quantidade de cistos e oocistos, o que minimiza, portanto, as chances de ocorrência de resultados falso-negativos.

De maneira geral, há escassez de literatura sobre as etiologias e alguns detalhes da epidemiologia das principais protozooses, dentre estas as de veiculação hídrica. Desta forma justifica-se uma pesquisa que determine o “status” sanitário de equinos, quanto aos principais protozoários zoonóticos e seu potencial risco de transmissão às pessoas que convivem em mesmo ambiente que estes animais.



## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 DESENVOLVIMENTO HUMANO E AS DOENÇAS PARASITÁRIAS

Segundo o Ministério da Saúde (2010) os movimentos de emergência de novas doenças transmissíveis como a AIDS; de ressurgimento em novas condições de doenças “antigas” como a cólera ou a dengue; de persistência de endemias importantes como a tuberculose; e de ocorrência de surtos inusitados de doenças como a Febre do Oeste do Nilo nos Estados Unidos, demonstram que tanto países em desenvolvimento como os desenvolvidos não estão livres das doenças infecciosas.

No Brasil, a partir do último quarto do século XX ocorreu uma perda de importância relativa das doenças parasitárias, principalmente as que contribuíram para criar uma falsa expectativa de que todo esse grupo de doenças estaria próximo à extinção. Entretanto o seu impacto na morbidade ainda é importante, principalmente aquele produzido pelas doenças para as quais não se dispõe de mecanismos eficazes de prevenção e controle (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Este mesmo órgão cita que no período compreendido entre o início da década de 1980 e da presente década, as doenças infecto parasitárias no Brasil apresentam-se em um quadro complexo que pode ser resumido em três grandes tendências: doenças transmissíveis com tendência declinante; doenças transmissíveis com quadro de persistência e doenças transmissíveis emergentes e reemergentes.

A crescente urbanização, industrialização e o avanço da agricultura e da pecuária proporcionam um maior contato entre as populações humanas, bem como de seus animais domésticos com as populações de animais silvestres nos seus habitats, facilitando a disseminação de agentes infecciosos e parasitários entre esses hospedeiros (CORRÊA e PASSOS, 2001).

## 4.2 VEICULAÇÃO DE ZONOSSES POR ANIMAIS DOMÉSTICOS

A cada dia, espécies animais são adotadas como “pet”, estreitando a convivência com seres humanos e modificando seu papel na relação homem-animal (JULIANO et al., 2006).

Para Overall (1997) compreender o papel do animal no grupo social humano a que pertence é essencial para alcançar os objetivos desejáveis na prática veterinária. Da mesma forma, Faraco e Seminotti (2004) destacam a importância da compreensão e do reconhecimento por parte dos profissionais, dessa nova realidade nas organizações sociais resultantes de grupos “multiespécies”, onde animais de estimação são considerados como “membros da família”.

A utilização de animais como terapia – Terapia Animal Assistida (TAA) foi utilizada intuitivamente por William Tuke em 1792, no tratamento de doentes mentais. Já equoterapia, uma modalidade TAA, teve seus primeiros relatos como tratamento médico no século XVIII, com o objetivo de melhorar o controle postural, a coordenação e o equilíbrio de pacientes com distúrbios articulares (DE PAUW, 1984). Friedmann (1990), foi um dos pioneiros no estudo dos efeitos da interação homem-animal sobre parâmetros fisiológicos e saúde cardiovascular humana, sendo que os resultados de diferentes estudos demonstraram que a TAA pode promover a saúde física através de três mecanismos básicos que incluem a diminuição da solidão e da depressão; diminuindo a ansiedade, os efeitos do sistema nervoso simpático e aumentando o estímulo para prática de exercícios. Consequentemente há um impacto positivo no controle das irritações diárias provocadas pelo “stress” e uma melhoria na qualidade de vida e saúde física dos indivíduos.

Animais domésticos e animais errantes são hospedeiros definitivos de parasitas com potencial zoonótico. Parasitas entéricos contaminam o meio ambiente, especialmente o solo/areia, pelas mais variadas formas e gêneros parasitários, favorecendo o risco de infecções ao homem. Essa exposição não é limitada apenas no âmbito doméstico, uma vez que animais domesticados são frequentemente levados por seus proprietários para passear, trabalhar e ou estão abandonados em áreas públicas, como praças e parques, destinados à recreação humana (SOMMERFELT et al., 2006).

Do ponto de vista epidemiológico, animais errantes têm um papel importante na contaminação do meio ambiente, uma vez que não recebem tratamento veterinário visando o controle parasitário e circulam por várias áreas públicas, favorecendo a disseminação de doenças infecciosas, sendo elas causadas por vírus, bactérias, protozoários ou fungos patogênicos. O parasitismo exerce uma série de reações sobre o hospedeiro, podendo causar perturbações mecânicas tissulares, reações inflamatórias, desequilíbrio nutricional neurológico e cognitivo, sangramentos intestinais, perda do apetite, obstrução intestinal, prolapso retal, e que dependendo do grau e situação imunológica pode levar o indivíduo a óbito (SANTOS e MERLINI, 2010). A deficiência nas condições de saneamento básico e de educação sanitária está, na maioria das vezes, relacionada à veiculação e transmissão de parasitas, onde aproximadamente 50% dos indivíduos infectados em todo o mundo são crianças em idade escolar, devido ao maior contato ao se exporem em caixas de areia de praças e parques públicos, creches e escolas (NUNES et al., 2000).

Vários estudos já foram desenvolvidos para avaliar a ocorrência de parasitas zoonóticos em areia de creches, praças e parques no Brasil. Entretanto, esses estudos são mais frequentes nas regiões Sul e Sudeste do país (PERUCA et al., 2012). Segundo Irwin (2002) ao longo dos séculos, houve muitas mudanças com relação às maneiras que a ciência clínica veterinária tem sido conduzida. Os veterinários que trabalham com os diversos animais domesticados estão enfrentando os novos desafios associados com as doenças parasitárias emergentes e reemergentes.

Faraco e Seminotti (2004) concluem que a ação do médico veterinário, orientando e facilitando a comunicação no grupo “multiespécie”, pode contribuir para a construção de um clima estável entre as pessoas e os animais de companhia, diminuindo assim a veiculação de doenças.

#### 4.3 DOENÇAS ENTÉRICAS ZONÓTICAS EM EQUINOS

Os patógenos de veiculação entérica podem ser elencados como uma das principais classes de microrganismos patogênicos para humanos e animais. Este grupo peculiar de organismos caracteriza-se por se manterem viáveis e com

capacidade infectante em condições hostis do ambiente, após serem eliminados nas fezes dos animais. Em sua grande maioria, estabelecem infecção nos susceptíveis mediante a contaminação dos alimentos de origem animal, água, verduras e frutas, formando uma cadeia epidemiológica. O contato estreito com animais, especialmente os de companhia, ou mesmo com o ambiente de criação ou o habitat dos animais, também representa elos nesta cadeia epidemiológica de transmissão de enteropatógenos dos animais para humanos (ACHA e SZYFRES 2003).

Segundo Fernandes (2010), o equino, especialmente o potro possui alta capacidade de ser acometido por doenças entéricas e esses parasitas fazem ciclo e são eliminados pelas fezes de herbívoros ou onívoros, incluindo equinos, bovinos, suínos, ovinos, caprinos e cervos, contribuindo assim com a contaminação de outros animais domésticos e humanos que vivem no mesmo ambiente.

Segundo Gomes et al. (2008), o *Cryptosporidium* spp. e a *Giardia* spp. são atualmente reconhecidos como os principais patógenos entéricos com potencial zoonótico. O *Cryptosporidium* spp. está amplamente disseminado na população de equinos do Jockey Club de Santa Maria e pode representar uma fonte de infecção significativa para a população da região.

#### 4.4. CRYPTOSPORIDIUM SPP.

*Cryptosporidium* spp. é um protozoário pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Coccidea, Ordem Eucoccidiorida, Família Cryptosporidiidae e Gênero *Cryptosporidium* (FAYER, 2007).

O gênero *Cryptosporidium* foi descrito pela primeira vez pelo parasitologista americano Ernest Edward Tyzzer em 1907, quando foi detectado em glândulas gástricas de camundongos de laboratório. Snyder et al., (1978) relatou o primeiro caso de *Cryptosporidium* em potros árabes com comprometimento do sistema imunológico.

*Cryptosporidium* é um parasita e tem sido reportado em todo mundo e em uma gama de hospedeiros, incluindo equinos, descritos como grandes excretores de oocistos em diferentes áreas geográficas (KOSTOPOULOU et al. 2015) e com alta

prevalência em potros (VERONESI et al. 2010), enquanto que em outros estudos, o pico de prevalência foi observado em animais adultos (MAJEWSKA et al. 2004).

A aplicação de técnicas moleculares para taxonomia e epidemiologia está ajudando a caracterizar novas e já existentes espécies e determinar as origens dos parasitos que irão facilitar a identificação de fontes de água contaminada com *Cryptosporidium* spp. (CHACÍN-BONILLA, 2007).

Os bezerros menores de 30 dias constituem uma das principais fontes de contaminação ambiental com oocistos de *Cryptosporidium parvum*, a principal espécie zoonótica do gênero (TZIPORI e WARD, 2002). Este parasita emergiu como um dos enteropatógenos mais importantes associados com diarreia neonatal bovina, junto com rotavírus, coronavírus, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.. A infecção pode ser assintomática ou ter curso com quadros clínicos de variada intensidade que vão desde a diarreia difusa e intermitente à diarreia aquosa profusa com desidratação concomitante (DEL COCO et al 2009).

De acordo com Fiuza et al., 2008, apesar do Brasil ser um dos maiores produtores de carne suína, existem ainda rebanhos com condições sanitárias precárias. No Estado do Rio de Janeiro, quase todas as instalações de produção de suínos que foram examinadas apresentavam níveis baixos de condições de higiene e eram localizados perto de casas e rios, sendo oocistos de *Cryptosporidium* spp. identificados por microscopia nesses locais. No entanto, não havia nenhuma informação sobre as espécies de *Cryptosporidium* presente em suínos brasileiros. Em 2011, Fiuza et al. confirmam a presença de genótipo suíno tipo II (PGII) por análise de sequenciamento (Genbank EU331243 and DQ182600). Os números de acesso ao GenBank atribuídos às sequências de nucleótidos determinados neste estudo foram GQ924104 and GQ924105. Consequentemente, pesquisas estão em andamento, mas ainda não se sabe quais os riscos que representam os suínos para a transmissão de criptosporidiose humana.

O genótipo equino de *Cryptosporidium* (B1-41) e *Cryptosporidium parvum* genótipo bovino (B2-8) foram identificados em cavalos da raça Prezwalski's por Ryan et al. (2003). Chalmers et al. (2005), detectaram que o genótipo 2 de *C. parvum* é um dos agentes etiológicos que acometem humanos. Grinberg et al. (2008), isolaram e identificaram por meio de biologia molecular *Cryptosporidium* em potros com diarreia na Nova Zelândia, para inferir sobre possíveis rotas de transmissão. Estes pesquisadores não concluíram a origem deste parasito ou o seu

potencial zoonótico, entretanto, foram isolados diferentes alelos de *C. parvum* e este polimorfismo refletiu a diversidade genética em *C. parvum*.

#### 4.4.1 Patogenia

Os oocistos podem ser transmitidos entre hospedeiros susceptíveis por meio do contato fecal-oral ou ingestão de água e alimentos contaminados por formas esporuladas do agente (FAYER et al., 2000).

Oocistos de *Cryptosporidium* são altamente resistentes às condições ambientais e à ação de produtos químicos. Esta característica deve-se a uma complexa barreira protetora, constituída de dupla camada de lipoproteínas e carboidratos, que conferem rigidez à sua parede (THOMPSON et al., 2008; PLUTZER, KARANIS, 2009). Dessecação, variações de temperatura, pH e exposição à luz ultravioleta podem reduzir o tempo de sobrevivência dos oocistos (SMITH, NICHOLS, 2010).

A patogenia e o quadro clínico da doença são influenciados por vários fatores que incluem entre eles idade, competência imunológica do indivíduo infectado e a associação com outros patógenos (RADOSTITS et al., 2000). A infecção por *Cryptosporidium* causa inflamação e atrofia das vilosidades intestinais resultando em perda da superfície de absorção, desequilíbrio no transporte de nutrientes e consequentemente comprometimento na produtividade animal (THOMPSON et al., 2008).

A duração da infecção e a patogenicidade da criptosporidiose são intimamente ligadas à condição imunológica do hospedeiro, variando de uma diarreia severa, mas auto-limitada, nos indivíduos imunocompetentes, até uma prolongada infecção sem tratamento, nos pacientes com comprometimento imunológico (ABRAHAMSEN et al., 2004).

#### 4.4.2 Características clínicas

A criptosporidiose causa inflamação e atrofia das vilosidades intestinais resultando em perda da superfície de absorção, desequilíbrio no transporte de

nutrientes e conseqüentemente comprometimento na produtividade animal (THOMPSON; PALMER; O'HANDLEY, 2008). Esta doença é mais grave quando o hospedeiro apresenta alguma condição imunossupressora, podendo ocorrer diarreia aquosa, má absorção e perda de peso (JOHNSON et al., 1997).

A infecção por *Cryptosporidium* foi descrita em humanos a partir de dois casos relatados em 1979 e de uma série de casos em 1980 (UNGAR, 1990). A maioria desses pacientes eram imunocomprometidos e o parasita foi considerado oportunista. Em 1982, quando a criptosporidiose foi associada à mortalidade de pacientes de AIDS, um primeiro surto foi reportado em indivíduos imunocompetentes (O'DONOGHUE, 1995; MMWR, 1982). Desde então têm sido detectada em diferentes grupos populacionais em mais de 50 países em todos os continentes (O'DONOGHUE, 1995).

De 58 casos de criptosporidiose notificados, até 1983, ao Centers for Disease Control and Prevention (CDC), nos Estados Unidos, 33 eram portadores da AIDS e sofriam de diarreia que era, geralmente, intensa e irreversível (FAYER e UNGAR, 1986). Segundo CDC (2009), a maioria dos casos ocorre em crianças menores de nove anos de idade.

#### 4.4.3 Diagnóstico

O diagnóstico da criptosporidiose é realizado rotineiramente por meio de exame coprológico (YODER e BEACH, 2010). A princípio, utilizavam-se apenas técnicas de microscopia, nas quais eram realizados esfregaços diretos com coloração de Ziehl Nielsen (SMITH, 2010). Com o avanço dos métodos de diagnóstico, as amostras eram submetidas a técnicas de concentração de oocistos com soluções hiper concentradas, com a finalidade de aumentar a sensibilidade de detecção. Posteriormente, técnicas de Imunofluorescência Indireta (IFI) se tornaram o método de eleição e eram mais sensíveis que os métodos tradicionais, além de facilitar a visualização do oocisto (QUÍLEZ et al., 1996). Entretanto, a execução dos métodos baseados em microscopia necessita de treinamento, são muito laboriosos e têm sensibilidade geralmente baixa (SANTÍN et al., 2004). Além disso, a identificação da espécie se torna impossível devido ao reduzido tamanho dos

oocistos, além da grande semelhança morfométrica entre oocistos de espécies diferentes (SUNNOTEL et al., 2006).

Os testes sorológicos para detecção de anticorpos tais como ELISA e Western Blot, além de não possibilitarem a identificação das espécies envolvidas na infecção, indicam apenas exposições passadas. O teste de ELISA em amostras fecais também pode ser utilizado para identificar infecções correntes sem, no entanto, realizar a identificação da espécie (SANTÍN e TROUT., 2007).

Apesar de restritos a laboratórios especializados, os atuais métodos de diagnóstico baseados em técnicas moleculares tais como nested PCR, Multiplex PCR, PCR-RFLP e sequenciamento de DNA são altamente sensíveis, apresentando resultados de alta confiabilidade (SANTÍN et al., 2004; SMITH, 2007). São capazes de detectar oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras em que normalmente seriam perdidos pelos métodos tradicionais de microscopia (SCORZA et al., 2003; McGLADE et al., 2003; SANTÍN et al., 2004).

A primeira PCR realizada para o diagnóstico da criptosporidiose foi feita por Laxer et al., (1990), e desde então muitas técnicas baseadas em biologia molecular foram descritas, entre elas a nested PCR, Multiplex PCR, PCR-RFLP e o sequenciamento de DNA (SMITH, 2007). Todas estas técnicas têm como alvo amplificar genes específicos na cadeia de DNA de *Cryptosporidium*. Os genes alvo mais comumente utilizados nas pesquisas acerca do diagnóstico do parasito são: 18S rRNA, HSP70, COWP e o gene da actina (SULAIMAN et al., 2000; 2002; XIAO et al., 1999). Entretanto, os genes HSP70, COWP e da actina apresentam uma grande diversidade na sequencia de nucleotídeos entre as muitas espécies de *Cryptosporidium*, o que torna difícil o desenho de iniciadores de PCR específicos baseado nestes genes, limitando, portanto, seu uso no diagnóstico molecular da criptosporidiose (SMITH, 2007). O gene 18S rRNA, por sua vez, tem como vantagem o grande número de cópias no DNA de *Cryptosporidium* e a presença de sequencias de nucleotídeos que se mantêm conservadas mesmo em espécies diferentes. Isso facilita o desenho de iniciadores, e conseqüentemente, a própria PCR (XIAO et al., 1999).

Utilizando-se os iniciadores descritos por Xiao et al. (1999) para o gene 18S rRNA, a primeira amplificação gera um produto de 1325pb, enquanto que os iniciadores internos amplificam um produto de cerca de 826pb.



Pensa-se que as infecções mistas por *Cryptosporidium* são incomuns, devido aos poucos relatos existentes. Entretanto, é de conhecimento que esse fato ocorre (CAMA et al., 2006; TANRIVERDI et al., 2003). O método de diagnóstico tradicional da PCR normalmente não detecta a presença de infecções mistas, pois a amplificação vai acontecer preferencialmente no gene da espécie ou genótipo de *Cryptosporidium* predominante na infecção, o que pode até mesmo comprometer o entendimento da epidemiologia da doença em humanos e animais (SANTÍN e ZARLENGA, 2009). Em áreas endêmicas e nos imunodeprimidos, as infecções mistas podem ser mais comuns do que se imagina (McLAUCHLIN et al., 2000).

A PCR e o RFLP são úteis para diferenciar as espécies e os genótipos de *cryptosporidium*. (CAREY et al 2004). A hibridação fluorescente “in situ” (FISH) utiliza nucleotídeos marcados que detectam com elevada especificidade regiões de interesse dentro de sequências de DNA e RNA. Atualmente, a maior parte dos ensaios FISH para detecção de *Cryptosporidium* baseiam na hibridização de RNA, que capta uma região variável da pequena subunidade (SSU) do RNA ribossomal nuclear, comumente denominada SSU RNAr. Esta é uma boa área para realizar a FISH, já que no interior da célula existe um alto número de cópias. Além disso detectaria exclusivamente oocistos viáveis, já que as RNases degradam o RNA trazendo a morte celular (JEX et al 2008).

#### 4.5 GIARDIA SPP

*Giardia* spp. é um protozoário entérico que afeta humanos, animais domésticos e silvestres (THOMPSON et al., 2000). Pertencem ao Filo Sarcocystophora, Subfilo Mastigophora, Classe Zoomastigophorea, Ordem Diplomonadida, Subordem Diplomonadina, Família Hexamitidae (RIVERA et al., 2002).

O gênero *Giardia* foi descrito por Kunstler em 1882, ao observar um flagelado presente no intestino de girinos de anfíbios anuros. Este gênero é constituído por protozoários cosmopolitas que ocorrem principalmente em regiões tropicais, mas pode ser encontrado em temperaturas variadas (SOGAYAR e GUIMARÃES, 2000).

A giardíase é uma infecção gastrointestinal muito comum, causada pelo flagelado *Giardia duodenalis* que infecta tanto humanos quanto animais (FENG e XIAO, 2011). Foi estabelecido que membros desta espécie são morfologicamente idênticos distribuídos em oito grupos de genótipos distintos (cepas A-H), baseados em polimorfismo de DNA ou proteínas (THOMPSON e MONIS 2012). Humanos e animais são infectados com cepas A e B, enquanto que cepas remanescentes se apresentaram mais restritas a uma gama de hospedeiros (LITH et al 2015).

#### 4.5.1 Patogenia

*Giardia duodenalis* (sinônimo de *G. intestinalis* e *G. lamblia*) é um protozoário intestinal encontrado em todos hospedeiros mamíferos (THOMPSON 2000). Em humanos, a giardíase é uma causa comum de gastroenterite parasitária e é a doença de maior interesse em todo mundo (AMAR et al. 2002). A doença é principalmente adquirida por ingestão oral de cistos e as manifestações clínicas variam de infecção assintomática a diarreia aguda (GARCIA et al 2000).

Em indivíduos imunocompetentes, giardíase é geralmente de curso autolimitante, mas pode se desenvolver em diarreia persistente e trazer risco de vida para indivíduos imunodeficientes e crianças malnutridas em países em desenvolvimento (AMAR et al. 2002).

Um grande número de pesquisas tem sido feitas utilizando métodos moleculares para determinar as cepas e genótipos de *G. duodenalis* em amostras fecais coletadas principalmente de animais de produção, cães e gatos, primatas e algumas espécies selvagens. Os resultados indicaram que cepas espécie-específicas são em grande maioria mais comum, sugerindo assim, um papel menor de transmissão zoonótica na epidemiologia da infecção humana (FENG e XIAO 2011; RYAN e CACCIO, 2013).

Os mecanismos pelos quais os enteropatógenos produzem diarreia são diversos, mas pode-se dividi-los entre os que promovem resposta inflamatória sem causar dano morfológico e os que alteram a estrutura da mucosa intestinal, com ou sem invasão tecidual. A magnitude e o significado funcional dessas respostas locais, são geralmente relacionadas ao número de parasitos. As infecções causadas por poucos parasitas são comumente assintomáticas, enquanto grande carga parasitária

causa manifestações intestinais que podem incluir a diarreia (MOTTA e da SILVA, 2002).

As espécies de *Giardia* causam alterações na ultraestrutura das vilosidades intestinais, de acordo com Gennari e Souza (2002), com encurtamento dos microvilos, esfoliação acelerada e diferenciação incompleta dos enterócitos com redução de aproximadamente 50% da área de superfície de absorção. Chávez et al. (1995) acrescentam que, em condições *in vitro*, isolados de trofozoítos de *Giardia* spp, oriundos de pacientes sintomáticos ou assintomáticos, prejudicam o epitélio em cultivo celular principalmente por depleção de suas vilosidades. Com isso a digestão e absorção de nutrientes e água ficam prejudicadas, ocorrendo decréscimo no tempo de trânsito, devido a um aumento da motilidade intestinal. Ocorre então a síndrome da má-absorção e digestão. Sogayar (2001), explica que um dos mecanismos mais aceitos para explicar a diarreia e má-absorção são as alterações funcionais e morfológicas da mucosa, provavelmente ocasionadas pelo processo inflamatório induzido pelo parasito, devido à reação imune do hospedeiro. Sogayar e Guimarães (2000) citam que a *Giardia* spp secreta várias proteases, algumas delas capazes de agir sobre as glicoproteínas da superfície das células epiteliais e romper a integridade da membrana. A normalidade da mucosa se restabelece com a erradicação dos parasitos.

#### 4.5.2 Características clínicas

Dos protozoários que frequentemente acometem os animais e o homem, a *Giardia* spp. tem despertado maior interesse dos pesquisadores, possivelmente por seu potencial como agente de zoonose, além de causar, em animais jovens, diarreia intermitente com comprometimento da digestão e absorção de alimentos, acarretando desidratação, perda de peso e morte (MUNDIM et al., 2003).

A infecção por *Giardia* spp. pode causar doença clínica moderada a severa ou permanecer assintomática (BECK et al., 2005). Em alguns casos pode causar diarreias disenteriformes, duodenites, jejunites, podendo colonizar a vesícula biliar, não sendo ainda relacionada diretamente nos quadros de colecistites. (RIVERA et al., 2002).

Comumente as fezes são pálidas, com odores fétidos e moles. Dificilmente apresenta-se na forma aquosa ou hemorrágica. Raramente é observada febre e outros sinais sistêmicos. Ocasionalmente, os animais são apresentados com sinais indicativos de afecção do intestino grosso (ETTINGER e FELDMAN, 1997).

De acordo com Rivera et al. (2002) as fezes podem se apresentar também pastosas ou líquidas, amareladas, espumosas, mucosas, fétidas, e a diarreia pode ser, permanente ou intermitente. Em certos casos observa-se intolerância à lactose com amostras de fezes contendo leite.

O início dos sintomas pode preceder a excreção de cistos nas fezes por mais de uma semana (JOKIPII, A.M. e JOKIPII, L., 1977) e a infecção pode desaparecer espontaneamente dentro de seis semanas, ou persistir por vários meses (RENDTORFF, 1954; SAGI et al., 1983; PICKERING et al., 1984).

A influência de fatores como a cepa do parasito, a duração da infecção, a dieta ou imunidade, pode ser importante para explicar a diversidade de sintomas associados à infecção (BECK et al., 2005).

#### 4.5.3 Diagnóstico

O método tradicional de diagnóstico é a pesquisa de cistos e trofozoítos, sendo que as fezes, após a coleta, devem ser examinadas imediatamente a fresco e coradas pelo iodo. Quando se utiliza um método de preservação como formalina ou álcool polivinil, as fezes são coradas pelo tricrômio ou pela hematoxilina e os cistos podem ser detectados. O exame seriado das fezes é necessário e aumenta a sensibilidade do método. Uma única amostra de fezes pode detectar cerca de 70% dos casos, aumentando para 85% quando três amostras distintas são analisadas. A excreção de cistos é variável a cada dia, sendo por isso importante que fezes coletadas em dias diferentes sejam examinadas. Para detectar trofozoítos, é preciso examinar fezes aquosas logo após a sua eliminação (MOTTA e da SILVA, 2002).

Apesar de existir uma tendência nos últimos anos à aplicação de técnicas de imunodiagnóstico, como a detecção de antígenos em fezes por meio de imunoenensaio enzimático (OLIVA et al., 1987; BAUMAN e GOTTSTEIN, 1987; MERINO et al., 1990), estas são mais aplicáveis na investigação e não na prática diária de diagnóstico nos laboratórios clínicos, pois a relação custo-benefício não

justifica seu emprego (NÚÑEZ et al., 1997). Além do mais, as técnicas de diagnóstico coproparasitológico são as mais utilizadas em programas de controle do parasitismo intestinal por seu baixo custo, simplicidade e sensibilidade (NÚÑEZ et al., 1997).

Outros métodos de diagnóstico de *Giardia* são: exame dos aspirados duodenais, biópsia intestinal e PCR (ETTINGER e FELDMAN, 1997; RIVERA et al., 2002).

O método de diagnóstico mais específico utilizado atualmente é a PCR, porém, uma limitação da técnica convencional baseada em apenas uma reação é a infecção mista, que torna o diagnóstico difícil, uma vez que a população de parasitas mais abundante é preferencialmente amplificada. Para contornar esta limitação, ensaios de nested PCR são executados, pois incluem primers cepa-específicos especificamente desenvolvidos (GEURDEN et al. 2007). Neste contexto, o uso da PCR em tempo real é esperado para trazer resultados mais relevantes, com primers cepa-específicos que podem ser utilizados em protocolo de PCR simples e a especificidade pode ser fortemente aprimorada pelo uso de probes (ALONSO et al. 2011), ou pela união de curvas de análises de produtos de rt-PCR (ALMEIDA et al, 2010; ZHANG et al, 2012).

#### 4.6 ENTAMOEBA SPP.

O gênero *Entamoeba* contém muitas espécies, seis das quais *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, *Entamoeba polecki*, *Entamoeba coli*, e *Entamoeba hartmanni* residem no lúmen intestinal humano. *Entamoeba histolytica* é a única espécie definitivamente associada a patologias em humanos, as outras são consideradas não-patogênicas e raramente causam doença intestinal (CLARK e DIAMOND, 1991; GARCIA e BRUCKNER, 1997). Durante a década de 1990, existiam provas suficientes para apoiar a separação formal de duas espécies morfológicamente indistinguíveis de amebas: a forma não-patogênica *E. dispar* e as potencialmente patogênicas *E. histolytica* (ABD-ALLA et al, 1993;. WHO, 1997).

*Entamoeba histolytica* é causadora de infecções comumente observadas em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Em países desenvolvidos, infecções por este protozoário são comumente observados em viajantes, imigrantes recentes, homossexuais e reclusos de instituições. Os seres humanos são classificados como o hospedeiro primário destes parasitas e a principal fonte de infecção é o cisto liberado por um paciente crônico ou portador assintomático. A infecção é principalmente transmitida através da ingestão de água ou alimentos contaminados por fezes que contêm cistos. (LEBER et al., 2006; STANLEY, 2003). Nas últimas décadas, muitos estudos têm relatado a ocorrência desta infecção em homossexuais, geralmente como o resultado de contato sexual oral-anal e oral-genital (YI CHEN et al., 2007;. STARK et al., 2008). A infecção de *E. histolytica* é conhecida como amebíase e é globalmente considerada a principal causa de mortalidade humana por parasitoses (HAQUE e PETRI, 2006) acometendo centenas de milhões de pessoas por ano (PAHO, 1997). Análise com base em dados publicados por Walsh (1986) indicaram que 10% da população mundial estava parasitada por *E. histolytica* e apenas 1% dos indivíduos infectados desenvolveram a forma invasiva da doença, ao passo que 9% não apresentavam sintomas. Os seres humanos são os hospedeiros e não parece existir outro animal reservatório tão significativo para *E. histolytica* (WALSH, 1986).

*Entamoeba histolytica* pode estar presente no esgoto e águas contaminadas onde os cistos podem permanecer viáveis por vários meses em baixa temperatura. O potencial para transmissão hídrica é maior nos trópicos, onde às vezes a taxa de transmissão pode exceder 50%, em comparação com as regiões mais temperadas, onde a prevalência na população em geral pode ser inferior a 10%. Contato pessoa a pessoa e contaminação dos alimentos por manipuladores infectados parecem ser os meios mais significativos de transmissão, embora água contaminada também desempenhe uma substancial função na transmissão. A ingestão de água contaminada por fezes e o consumo de culturas alimentares irrigadas com água contaminada pode, portanto levar à transmissão de amebíase. Os cistos são relativamente resistentes à desinfecção e pode não ser inativado por cloração geralmente aplicado no tratamento de água (TENGGU e NORHAYATI 2011). Dentro de um plano de segurança da água, medidas de controle podem ser aplicadas para gerir o risco potencial de *E. histolytica* incluindo a prevenção da contaminação da fonte de água por dejetos humanos, seguido de tratamento adequado e proteção

das águas durante a distribuição (WHO, 2004). *Escherichia coli* (coliformes termotolerantes) não pode ser associado como um indicativo da presença/ausência de *E. histolytica* em abastecimento de água potável, devido à resistência dos cistos do protozoário aos desinfetantes (TENGGU e NORHAYATI, 2011).

Todos os dados de morbidade e mortalidade causada por *E. histolytica* primariamente existentes, eram incluídos como doença invasiva por este protozoário. No entanto, como a maioria dos dados de prevalência foram associados a indivíduos assintomáticos com cistos detectados em suas fezes estes foram atualmente classificados como infectados com a forma não patogênica de *E. dispar*, assim a definitiva prevalência de *E. histolytica* tornou-se um questão de especulação. Por outro lado, o papel de *E. moshkovskii*, uma ameba vida livre que é indistinguível na sua forma de cisto e trofozoíto da *E. histolytica* e *E. dispar*, está presente em infecções humanas e ainda deve ser definido de forma adequada. *Entamoeba moshkovskii* foi isolada pela primeira vez a partir de efluentes de esgoto e reconhecida como um organismo vivo onipresente em 1941 (TSHALAI, 1941). Um estudo relatou uma alta prevalência e associação de *E. moshkovskii* com *E. histolytica* e *E. dispar* em infecções em crianças em Bangladesh (ALI et al., 2003). Dados em humanos referentes ao isolamento destas espécies têm sido reportados por muitos estudos em todo o mundo (CLARK et al, 1991;. HAQUE et al, 1998;. PARIJA e KHAIRNAR, 2005; FOTEDAR et al., 2007; TANYUKSEL et al., 2007; BECK et al., 2008; AYED et al., 2008; NAZEMALHOSSEINI MOJARAD et al., 2010; HAMZAH et al., 2010).

Algumas das descrições epidemiológicas originais distinguindo infecções de *E. histolytica* de *E. dispar* foram feitas em estudo conduzido entre a população assintomática rural na África do Sul. Cultura e análise de zimodema foram utilizados para a identificação de *Entamoeba* spp. e os achados mostraram uma prevalência global de complexo *E. histolytica-E. dispar* em aproximadamente 10%. Em uma análise mais aprofundada, foi revelado que 90% dos indivíduos assintomáticos foram infectadas com a forma não-patogênica *E. dispar* e 10% abrigou a forma assintomática *E. histolytica* (GATHIRAM e JACKSON, 1985). Foi subsequentemente observado que aproximadamente 10% dos portadores assintomáticos de *E. histolytica* desenvolveriam a doença invasiva, enquanto a maioria dos outros debelaram espontaneamente a infecção em um ano (BLESSMANN et al, 2002a;. HAQUE et al., 2002).

Surtos de amebíase já foram relatados em vários países (LALLA et al. 1992), estes autores descreveram um surto de *E. histolytica* e *G. lamblia* em viajantes que retornaram dos trópicos. De 160 viajantes de várias regiões da Itália que tinham organizado parte da viagem em cinco dias para Phuket, Tailândia e foram acomodados no mesmo hotel de luxo, 17 apresentaram abscesso ou colite amebiana. Um questionário que focou o consumo de alimentos e bebidas, prática conhecida por ser fonte de infecção intestinal em áreas endêmicas, foi levantado a partir destes 17 pacientes, bem como 41 de 74 viajantes assintomáticos. As amostras de fezes para exame parasitológico também estavam disponíveis. Em pacientes com afecções por abscesso amebiano, os anticorpos para *E. histolytica* também foram determinados. No geral, exames parasitológicos foram negativos em oito (13,8%) pacientes e 50 amostras de 58 (86,2%) foram consideradas positivas. A prevalência de *E. histolytica* foi de 72,4% e 28 indivíduos (48,3%) apresentaram resultado de exame de fezes positivo para ambos protozoários. Nenhum outro parasita intestinal foi achado. O consumo de bebidas com gelo, sorvete e frutas frescas foi significativamente associado com infecções por *E. histolytica*. Vreden et al. (2000) relataram um surto da amebíase em uma família nos Países Baixos. O caso relacionado depois que uma menina de cinco anos que apresentou um histórico de seis semanas de dor abdominal e diarreia sanguinolenta sem febre. Cultura de fezes para patógenos bacterianos manteve-se negativa. Pelo fato de que a menina nunca tinha viajado para fora do país, a possibilidade de amebíase não foi considerada pelo médico até que sua mãe apresentou um histórico de disenteria amebiana e cisto persistente após o regresso da Índia 13 anos atrás. Em complementação ao caso, nos contatos da mãe estavam seu marido, um filho de quatro e um de dois anos de idade, além de uma babá. Nenhum dos contatos familiares tinha viajado fora da Europa Ocidental ou tinha desenvolvido sinais ou sintomas que eram consistentes com disenteria ou doença invasiva extra intestinal. No entanto, o filho mais velho apresentou um episódio de cólicas abdominais e diarreia sem sangue algumas semanas depois que sua irmã tinha desenvolvido disenteria amebiana. Trofozoítos e cistos de *E. histolytica* e *E. dispar* foram encontrados nas fezes de sua mãe e outros contatos familiares. Este surto da amebíase demonstra que, mesmo com padrões ocidentais de higiene, a passagem de cisto persistente pode resultar na transmissão de *E. histolytica* para contatos familiares muitos anos mais tarde. No Japão, Niichiro et al. (1999) relataram um



surto amebíase entre os moradores de duas instituições para deficientes mentais na cidade de Osaka. Em Fevereiro de 1996, um abscesso hepático, devido a infecção por *E. histolytica* foi encontrado em um residente da instituição (A). Em junho, vários residentes em instituição (B) queixaram-se de diarreia e suas fezes continham *E. histolytica*. As amostras de fezes de residentes, seus pais e os funcionários das duas instituições foram examinados para *Entamoeba*. Treze dos 79 residentes na instituição A (16,5%) e 29 de 69 residentes da instituição B (42,0%) eram carreadores de cistos de *E. histolytica*. A relação dos surtos nas duas instituições revelou-se obscura, mas poderia estar relacionada a quatro dos residentes da instituição A que tinham sido moradores da instituição B e uma vez que estiveram na instituição B adquiriram o parasita.

#### 4.6.1 Patogenia

*Entamoeba histolytica* foi descrita pela primeira vez por Lambl em 1859 e a patogênese desta infecção foi descrita pela primeira vez em São Petersburgo por Fedor Losch em 1875 nas fezes de um Russo que sofria de disenteria. A infecção de *E. histolytica* se desenvolve a partir da ingestão de cistos com quatro núcleos e a desencistação no lúmen intestinal produz trofozoítos e assim, coloniza o intestino grosso. Os trofozoítos podem permanecer confinados no lúmen intestinal alimentando-se de bactérias e os restos celulares. A galactose e N-acetil-D-galactosamina (Gal / GalNAc) - lectinas específicas são utilizadas pelos trofozoítos para se aderir às mucinas do cólon e colonizar o intestino grosso, a agregação dos trofozoítos na camada de mucina irá desencadear encistações e os cistos em seguida, são excretados nas fezes (PETRI et al., 2002).

Episódios de colite ocorrem quando trofozoítos penetram no epitélio intestinal e a capacidade dos trofozoítos de invadir mucosa intestinal depende da sua genética, perfil imunoenzimático, sua capacidade de produzir enzimas proteolíticas e a resistência à lise mediada por complemento. Invasão por trofozoítos são iniciadas pela morte de células epiteliais e células inflamatórias (neutrófilos e linfócitos). Desta forma, a interação da ameba com o epitélio intestinal causa uma resposta inflamatória marcada pela ativação do fator nuclear e secreção de linfocinas. O desenvolvimento de resposta epitelial pode depender dos fatores de virulência do

trofozoíto e isso vai levar a anomalias intestinais através de danos mediados por neutrófilos. Na lesão invasiva precoce com ulceração superficial, três principais eventos consecutivos ocorrem e há uma erosão superficial focal, seguido por pequenos focos de microinvasão glandular e leve a moderada infiltração de neutrófilos na lâmina própria do epitélio (ECKMANN et al, 1995;. SEYDEL et al., 1998).

O mecanismo que envolve a erosão superficial do epitélio é complexo onde uma barreira protetora de muco é quebrada, assim trofozoítos de *E. histolytica* podem aderir e fazer um dano contato-dependente e lise de células do epitélio. Lectinas, amebapores e proteases são as três moléculas envolvidas neste evento (MARTINEZ- PALOMO et al., 1985). O segundo evento é caracterizado por contínua lise de células com o auxílio de enzimas proteolíticas (cisteína proteínase, fosfolipase e hemolisina) que degradam elastina, colágeno e fibrinogênio. A penetração dos trofozoítos nos tecidos também é auxiliada por meio de sua atividade de locomoção e degradação proteolítica da matriz extracelular da mucosa do cólon (ESPINOSA- CANTELLANO e MARTINEZ-PALOMA, 2000). No evento final, a infiltração de neutrófilos e de outras células inflamatórias ao redor dos trofozoítos conduzem a uma lise rápida das células inflamatórias e necrose tecidual (ESPINOSA-CANTELLANO e MARTINEZ- PALOMA, 2000). Enzimas lisossomais mediadas por peptídios liberadas por células inflamatórias lisadas, contribuem para a destruição do tecido hospedeiro e aumento da lesão. Neutrófilos representam mais de 90% dos granulócitos e respondem a uma variedade de citocinas e fatores solúveis durante o processo inflamatório. O primeiro sinal de agressão do cólon visualizado por sigmoidoscopia apresenta um espessamento não específico da mucosa ou micro nódulos com a cabeça em tamanho e forma de cabeça de alfinete.

A lesão invasiva tardia é caracterizada por uma grande extensão de úlcera de mucosa em uma profunda área da submucosa. Uma vez que o epitélio inter glandular foi invadido por um trofozoíto, o tecido subjacente oferece pouca resistência, permitindo a extensão da úlcera lateralmente, criando a forma clássica de lesão amebiana (STANLEY, 2003). O exame histopatológico mostra áreas de necrose e congestão vascular com mínima inflamação em contraste com a extensão da lesão. Trofozoítos podem ser encontrados em a camada superficial das úlceras com infecção bacteriana causando deficiência de suprimento de sangue levando à necrose, hemorragia e gangrena e perfuração posterior da parede intestinal (HAQUE

et al., 2003). Complicações intestinais ocorrem em 1-4% dos pacientes e complicação invasiva extra-intestinal não é comum e pode estar presente em 0,1 a 1% de pacientes sintomáticos.

#### 4.6.2 Características Clínicas

As características clínicas de amebíase assintomática a disenteria amebiana e amebíase extra-intestinal invasiva, se manifestam mais comumente sob a forma de abscessos no fígado e os pulmões. Tem sido reconhecido que expressão da doença amebíase varia geograficamente. Por exemplo, doença invasiva no Egito é predominantemente colite amebiana (ABD-ALLA et al., 2002), enquanto que em África do Sul existe uma taxa excessiva de abscesso amebiano hepático (ALA). De fato, na cidade de Hue, Vietnã, foi relatada uma frequência de ALA de 21 casos por 100.000 habitantes (BLESSMANN et al., 2002b).

Indivíduos que abrigam *E. histolytica* (portadores assintomáticos) podem desenvolver títulos de anticorpos na ausência de doença invasiva (JACKSON et al, 1985;. e GATHIRAM JACKSON, 1987; RAVDIN et al., 1990). Infecção assintomática com *E. histolytica*, se não tratada pode levar a disenteria amebiana e uma vasta gama de outras doenças invasivas mas, frequentemente, a infecção se resolve espontaneamente, sem o desenvolvimento de doenças (GATHIRAM e JACKSON, 1987; HAQUE et al., 2001; BLESSMANN et al., 2002b). Os estudos de Cohort relataram que quando os indivíduos assintomáticos não foram tratados durante um ano, 4 a 10% deles desenvolveram colite ou doenças extra intestinais (GATHIRAM e JACKSON, 1987;. HAQUE et al, 2001).

O processo da colite amebiana aguda tem um início gradual, com uma história de 1-2 semanas de leve a moderada dor abdominal e sensibilidade, tenesmo e diarreia aquosa com cinco a sete episódios por dia e grande quantidades de fezes, muco abundante, com ou sem sangue. Cerca de 80% dos pacientes queixam-se de dor abdominal localizada; alguns pacientes podem ter apenas diarreia intermitente alternando com prisão de ventre. A febre é incomum, ocorrendo em menos de 40% dos pacientes (ADAMS e MACLEOD, 1977).

Esta síndrome desaparece dentro de alguns dias utilizando-se tratamento anti-amebiano apropriado. Casos graves de colite amebiana são caracterizados por

fezes disentéricas, difusa dor abdominal, febre alta e severa desidratação e o paciente geralmente aparenta muito doente. Os diagnósticos diferenciais incluem a infecção por bactérias, tais como *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* e *Escherichia coli* enterohemorrágica e as causas não infecciosas que incluem a doença inflamatória do intestino, colite isquêmica e diverticulite. Outros espectros de amebíase intestinal aguda incluem extensa colite fulminante necrosante, megacólon tóxico e ulceração perianal. Paciente com colite amebiana fulminante geralmente se apresenta com profusa diarreia sanguinolenta, febre, leucocitose acentuada, e dor abdominal generalizada, muitas vezes com sinais peritoneais e amplo envolvimento do cólon (TAKAHASHI et al., 1997). Estes mesmos autores citam que embora a colite necrosante fulminante e o megacólon tóxico sejam muito raros, eles são geralmente associados a uma alta taxa de mortalidade.

Outro espectro clínico da amebíase intestinal é amebíase intestinal crônica e o paciente nesta condição se apresenta com dor abdominal intermitente, diarreia e perda de peso. Os doentes que estão em maior risco de doença grave incluem aqueles que são jovens, idosos, desnutridos, grávidas e aqueles que estão recebendo corticosteróides. Estudos em áreas não endêmicas de amebíase isto é, Japão, Taiwan, República da Coreia do Sul e Austrália têm relatado *E. histolytica* como um patógeno emergente em homens homossexuais (MSM) (OHNISHI et al., 2004; HUNG et al., 2005; TSAI et al., 2006; PARK et al., 2007; STARK et al., 2008). Homossexuais são também relatados por estarem em maior risco para desenvolver a amebíase invasiva (HUNG et al., 2005).

Complicações agudas da doença intestinal incluem sangramento, perfuração, peritonite, ulceração da pele perianal e fístulas retrovaginal. Úlcera profunda pode levar a estenose e adesão e resultar em obstrução intestinal. Ameboma com formação tecidos de granulação anelar no cólon, no ceco e no cólon ascendente podem simular um câncer de cólon sendo uma rara e tardia complicação da amebíase intestinal (ADAMS e MACLEOD, 1977). Em algumas ocasiões, a *E. histolytica* na forma de trofozoítos entrar na corrente sanguínea e se dissemina a outros locais no organismo.

Anemia, leucocitose e elevação fosfatase alcalina são frequentemente observados, mas icterícia, elevação de transaminases, e eosinofilia são incomuns (GUERRANT, 1986). Os pacientes mais velhos tendem a apresentar doença crônica, com duração superior a duas semanas. Eles têm menos febre (apenas

30%), e podem ter uma doença debilitante com significativa perda de peso (KATZENSTEIN et al., 1982). O número de pacientes com ALA aguda parece estar aumentando, reflexo possivelmente do diagnóstico precoce e um melhor acesso aos médicos. Neste caso, caracterizada por uma significativa preponderância do sexo masculino onde a doença vista mais comumente em pacientes que residem em ou emigraram de uma área endêmica (HUGHES e PETRI, 2000). Amebíase cutânea é uma rara manifestação da infecção extra intestinal de *E. histolytica* (MHLANGA et al., 1992). Em crianças sempre ocorre na região anogenital ou perineal como resultado da inoculação direta de trofozoítos pelo contato prolongado com fezes infectadas na fralda. Inoculação diretamente de pele também foi relatada a partir de coceira, coito anal ou vaginal e após a drenagem cirúrgica ou ruptura espontânea de abscesso em ponto de colostomia ou incisão de laparotomia (MAGANA-GARCIA e ARISTA-VIVEROS, 1993)

#### 4.6.3 Diagnóstico

Técnicas microscópicas aplicadas em laboratório de diagnóstico clínico incluem preparação a fresco, concentração, e esfregaços corados para a identificação de *E. histolytica*, *E. díspar* e *E. moshkovskii* em fezes.

Microscopicamente, trofozoítos podem ser detectado no tecido submucoso ou amostras fecais, utilizando solução salina e coloração temporária e o resultado pode ser confirmado pela técnica de coloração permanente ou seja coloração de tricrômico. Assim que a *E. histolytica* invade a mucosa do cólon, as fezes são quase universalmente positivas para sangue oculto.

O exame microscópico direto é um método muito insensível (<10%), que é realizado em espécime fresco (HUSTON et al., 1999). A amostra deve ser examinada dentro de uma hora da coleta para procurar trofozoítas em movimento e pode conter eritrócitos. No entanto, em pacientes que não apresentem disenteria aguda, trofozoítos não conterão hemácias. Pacientes carreadores assintomáticos possuem geralmente cistos na amostra fecal. Embora a técnica de concentração seja útil em demonstrar cistos, a utilização de esfregaços corados permanentemente (tricrômico ou hematoxilina férrica) é um método importante para a recuperação e identificação de espécies de *Entamoeba*. Microscopia é um método menos confiável

de identificação de espécies *Entamoeba* do que qualquer teste de detecção por cultura ou de antígenos (KROGSTAD et al., 1978; HAQUE et al., 1995). A sensibilidade da microscopia pode ser pobre (60%) e confusões com falso-positivo podem ocorrer devido a semelhança de macrófagos com trofozoítos, polimorfonucleares (PMN) com cistos (especialmente quando os núcleos de PMN estão divididos em lóbulos) e outras espécies de *Entamoeba* (GONZALEZ-RUIZ et al., 1994; HAQUE et al., 1997; HAQUE et al., 1998; TANYUKSEL e PETRI, 2003). Como trofozoítos de *Entamoeba* geralmente se degeneram rapidamente em amostras fecais não fixadas (PROCTOR, 1991) e refrigeração não é recomendada, as amostras devem ser preservadas com um fixador que previna a degradação da morfologia do parasita e permita a realização de coloração permanente. Os fixadores usados para o procedimento de concentração incluem o líquido de Schaudinn's, mertiolate iodo-formalina (MIF), formalina ácido acético-acetato de sódio (SAF) ou formalina a 5% ou 10%. Os fixadores para a coloração de esfregaços permanente como o tricrômio, hematoxilina férrica e coloração de Ziehl-Neelsen são o polivinil álcool modificado (PVA) e SAF. O recomendado para o exame é de coleta de no mínimo de três amostras de fezes em não mais que 10 dias, uma vez que estes organismos podem ser excretados intermitentemente ou podem ser distribuídos de forma desigual nas fezes. Isto melhorou a taxa de detecção de 85 a 95% (LI e STANLEY, 1996).

As técnicas de cultura para o isolamento de espécies *Entamoeba* já estão disponíveis há mais de 80 anos. Os meios de cultura incluem polixênico (bifásico e monofásico) e sistemas axênico. Cultivo polixênico é definido como ao crescimento do parasita na presença de um flora indefinidos (CLARK e DIAMOND, 2002). A cultura polixênica de *E. histolytica* foi primeiro introduzida por Boeck e Drbohlave em 1925 num meio de solução difásica de ovo e uma modificação deste meio (Locke-egg) é usado ainda hoje. Diferentes meios monofásicos que foram desenvolvidos para *E. histolytica* são à base de gema de ovo meio de infusão Balamuth (BALAMUTH, 1946), meio de Jones (JONES, 1946), e TYSGM-9 (DIAMOND, 1982). Dos diferentes meios de cultivo desenvolvidos para o cultivo polixênico de *E. histolytica*, apenas três meios, difásico Locke-egg, meio de Robinson (ROBINSON, 1968) e o monofásico TYSGM-9 (DIAMOND, 1982) são mais comumente usados. O cultivo Axenico envolve cultivo de parasitas na ausência de qualquer outras células de metabolização (CLARK e DIAMOND, 2002). O cultivo axênico de *E. histolytica* foi

primeiramente conseguido por Diamond (1961). O meio monofásico TP-S-1 foi desenvolvido e amplamente utilizado para a cultura de *E. histolytica* em diferentes laboratórios de pesquisa (DIAMOND, 1968; CLARK e DIAMOND, 2002). TYIS- 33 (DIAMOND, HARLOW e CUNNICK, 1978) e YI-S (DIAMOND, CLARK e CUNNICK, 1995) são os meios de comunicação mais utilizados para o cultivo axênico de *E. histolytica* (CLARK e DIAMOND, 2002).

Cultura de *E. histolytica* pode ser realizada a partir de amostras fecais, amostras de biopsia retal ou aspirados de abscesso hepático. Como os aspirados de abscesso hepático de pacientes são ALA geralmente estéreis (98% dos casos) (BLESSMANN et al., 2002b), a adição de uma bactéria ou um tripanossomatídeo é necessária antes inoculação de amebas em cultura polixênica (FREEDMAN, MADDISON e ELSDON-DEW, 1958; WANG, JEN e CRUZ, 1973; CLARK e DIAMOND, 2002). A taxa de sucesso para a cultura de *E. histolytica* é entre 50 e 70% em laboratórios de referência (CLARK e DIAMOND, 2002). Como a cultura de *E. histolytica* de amostras clínicas, tais como fezes ou abscesso hepático tem uma taxa de falso-negativo significativa e é tecnicamente difícil, por isso não foi adotado como um exame de rotina em laboratório de análises clínicas. *Entamoeba dispar* podem ser cultivadas em meio de cultura polixênico, no entanto, a maioria dos isolados crescem mal na cultura monoxênica e o crescimento de apenas algumas cepas tem sido relatada como sendo viável na cultura axênica, sugerindo que *E. dispar* podem ser menos capazes do que *E. histolytica* na obtenção de nutrientes em um meio isento de partículas (CLARK, 1995; KOBAYASHI et al., 1998). O uso de diferentes meios para a cultura de *E. dispar* tem sido investigado e estes estudos indicam que YI-S não pode ser um meio adequado para a cultura de *E. dispar* (KOBAYASHI et al., 1998). Para cepas de *E. moshkovskii*, meios de cultura empregados incluem TTYSB- monofásico com tripanossomatídeo, TPS1-GM - Monofásico para a cultura de axênica de amebas (DIAMOND, 1968) e o meio TP-S-1- GM monofásico (DIAMOND e BARTGIS, 1970). Outros meios que contêm soro de bovino utilizado para cultura de *E. moshkovskii* incluem meio axênico TYI-S- 33 com 10% de soro de bovino a 24°C (DIAMOND, HARLOW e CUNNICK, 1978) ou meio polixênico TYSGM-9 com 5% de soro bovino em ambos 24°C ou 37°C (DIAMOND, 1982).

O trabalho pioneiro de Sargeant et al. (1978) demonstraram que a análise de isoenzima de amebas cultivadas permitiria à diferenciação de espécies *Entamoeba*.

Um zimodema é definido como um grupo de cepas de ameba que compartilham o mesmo padrão eletroforético e mobilidades para várias enzimas. Zymodemes consistem em padrões electroforéticos das enzima exoquinase, isomerase de fosfato de glucose e isoenzima fosfoglucomutase (SARGEAUNT et al., 1987). Um total de 24 zimodemas diferentes foram descritos, dos quais 21 são isolados de humanos (9 de *E. histolytica* e 12 de *E. dispar*). A presença de amido no meio influencia o mais variável padrão de zimodema (BLANC e SARGEAUNT, 1991) e muitos zymodemes "desaparecem" após a remoção das floras bacterianas, o que sugere que pelo menos algumas das bandas são de origem bacteriana, em vez de ter origem de amebas (JACKSON e SUPERSAD, 1997). Se os zimodemas definidos por bandas estáveis são contados, apenas três permanecem como de *E. histolytica* (II, XIV e XIX) e um para *E. dispar* (I). A análise de isoenzima (zimodema) de amebas cultivadas permite a diferenciação de *E. histolytica* e *E. dispar*, e foi considerada o padrão ouro para o diagnóstico de infecção amebiana antes do desenvolvimento de técnicas mais recentes baseadas em DNA. Muitos diferentes ensaios foram desenvolvidos para a detecção de anticorpos, incluindo hemaglutinação indireta (IHA), aglutinação em látex, imunoeletroforese, contraimunoeletroforese (CIE), o teste de difusão em gel amebiano, imunodifusão, fixação de complemento, ensaio de imunofluorescência indireta (IFA) e ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA). Uma variedade de ensaios de imunológicos para a detecção de anticorpos de *E. histolytica* no soro humano também estão disponíveis comercialmente. Testes de fixação do complemento parecem ser menos sensíveis do que outros, costumam mais para serem executados e não são usados pela maioria dos laboratórios. IHA é simples de executar e foi demonstrado ser altamente específica (99,1%) como ferramenta de diagnóstico para pacientes infectados com vírus da imunodeficiência humana com sintoma gastrintestinal (HUNG et al., 1999). No entanto, a baixa sensibilidade pode levar a resultados falso-negativo em comparação com os resultados de ELISA. O teste de aglutinação em látex parece detectar o mesmo anticorpo como em IHA. Kits comerciais são disponíveis e o teste pode ser realizado em 10 min. No entanto, devido a reações inespecíficas, a especificidade deste teste parece ser desapontante (SANCHEZ-GILLEN et al., 2000). Imunoeletroforese, CIE e imunodifusão usam a propriedade de anticorpo e precipitação de antígeno na membrana de gel de agar. Sheehan et al. (1979) relataram que a detecção de anticorpo contra *E. histolytica* extra intestinal pela CIE é demorado, mas tem uma



elevada sensibilidade (100%) em pacientes com amebíase invasiva. A detecção de anticorpos utilizando o ensaio IFA se mostrou ser rápido, confiável e reprodutível e ajuda a diferenciar ALA de outras espécies não amebicas. Em adição a isto, os ensaios de IFA tem sido usados para diferenciar entre infecções antigas (tratadas) e doença agudas ou presente (GARCIA et al., 1982). Um estudo realizado por Jackson et al. (1984) indicaram que o monitoramento de níveis de imunoglobulina M (IgM) usando o IFA podem ser de valor clínico em um curto período de tempo após a infecção, com mais de metade dos sujeitos tendo resultados negativos aos 6 meses ou 100% tornando-se negativa por 46 semanas após tratamento. Em ALA a sensibilidade do IFA é relatada como sendo de 93,6%, com uma especificidade de 96,7%, tornando-a mais sensível do que o ELISA (SHAMSUZZAMAN et al., 2000). Um teste negativo, portanto, indica que um paciente nunca teve amebíase invasiva. No entanto, este teste requer habilidades em cultura e subsequente preparação de antígeno, sendo difícil aplicar em uma rotina de laboratório clínico (PATTERSON e SCHOPPE, 1982). ELISA é o ensaio mais popular no diagnóstico laboratorial em todo o mundo e é usado para estudar a epidemiologia de doença assintomática (GONZALEZ et al., 1995) e o diagnóstico de amebíase sintomática após exame fecal. Este método é suficiente para fins de clínica, em particular para o diagnóstico de pacientes com ALA e pode ser facilmente realizado num laboratório clínico. Pode também ser útil na avaliação de infecções intestinal e extra-intestinal, onde amebíase é suspeita, mas os organismos não podem ser detectados nas fezes (ROSENBLATT, SLOANE e BESTROM, 1995). Um microtítulo de ELISA para detectar anticorpos contra *E. histolytica* (LMD Laboratories Inc., Carlsbad, CA) tem se mostrado ser 97,9% sensível e 94,8% específica para a detecção de anticorpos de *E. histolytica* em pacientes ALA (HIRÁ et al., 2001).

Vários pesquisadores têm desenvolvido métodos de ELISA para a detecção de antígenos nas amostras de fezes. Estes testes de detecção de antígeno têm uma sensibilidade que se aproxima de cultura de fezes e são rápidos de executar. Kits de ELISA baseados em antígenos que são específicos para a *E. histolytica* utilizam anticorpos monoclonais contra a Gal / GalNAc-Lectina específica de *E. histolytica* (*E. histolytica* II; TechLab, Blacksburg, VA) ou anticorpos monoclonais contra antígeno rico em serina de *E. histolytica* (Optimum kit S; Merlin Diagnostika, Bornheim-Hersel Alemanha). Outros kits de ELISA para detecção de antígeno incluem o *Entamoeba* CELISA PATH Kit (Cellabs, Brookvale, Austrália), que utiliza um anticorpo

monoclonal específico para lectina de *E. histolytica*, e ProSpect EIA (Remel Inc. ; anteriormente fabricado pela Alexon-Trend, Inc., Sunnyvale, CA), que detecta antígeno específico de *E. histolytica* em espécimes fecais. Em adição aos ensaios clínicos acima mencionados, testes de detecção baseados em pesquisas incluíram o uso de anticorpos monoclonais contra um antígeno rico em lectina de superfície (PETRI e SINGH, 1999), um lipofosfoglicano (MIRELMAN et al., 1997), uma lectina de adesão do antígeno amebiano de 170-kDa detectada na saliva (ABD-ALLA et al., 2000) e um antígeno descaracterizado (WONSIT et al., 1992). O kit de *E. histolytica* TechLab foi projetado em 1993 para detectar especificamente *E. histolytica* nas fezes (HAQUE et al., 1997; HAQUE et al., 1998). A lectina é conservada e é altamente imunogênica e por causa das diferenças antigênicas nas lectinas de *E. histolytica* e *E. dispar*, o teste permite a identificação específica dos causadores da doença *E. histolytica*. O nível de detecção de antígenos amebianos é bastante elevada, exigindo aproximadamente 1.000 trofozoítos por poço (HAQUE et al, 1993; MIRELMAN et al, 1997). No entanto, este teste sofre a desvantagem de que os antígenos são detectados e desnaturados por fixação da amostra de fezes, portanto, limitando os testes para amostras frescas ou congeladas. No entanto, este teste tem demonstrado boa sensibilidade e especificidade para detecção do antígeno de *E. histolytica* nas fezes espécimes de pessoas que sofrem de colite amebiana e infecção intestinal assintomática (HAQUE et al., 1995, 1997, 1998). O ProSpect EIA (Remel Inc.) é uma microplaca EIA que detecta tanto *E. histolytica* e *E. dispar*. No entanto, este ensaio não pode diferenciar entre *E. histolytica* e *E. dispar*. A vantagem deste teste é que ele pode ser realizado no estado fresco, congelado, mas não em amostras fecais fixadas em formalina. A sensibilidade do ProSpect EIA foi comparado com o de microscopia convencional (utilizando montagens diretas e métodos de concentração) para o diagnóstico de *E. histolytica* e *E. dispar*, foram relatadas uma sensibilidade de 78% e especificidade de 99% (ONG et al., 1996). Em outro estudo, por Gatii et al. (2002), o relato da sensibilidade e especificidade do ProSpect ELISA foram 54,5% e 94%, respectivamente, em relação à cultura e identificação de zimodema para *E. histolytica* / *E. dispar*.

O Triage Parasite Panel (TPP) é o primeiro ensaio imuno-cromatográfico (Biosite Diagnóstico Ins., San Diego, CA) para a detecção simultânea de antígenos específicos para *G. lamblia*, *E. histolytica/dispar* e *C. parvum*. A tira imuno cromatográfica utilizada neste ensaio é revestida com anticorpos monoclonais

específicos para antígeno de superfície de 29-kDa (*E. histolytica/dispar*), alfa-1-Giardin (*G. lamblia*), e proteínas dissulfeto isomerase (*C. parvum*). Uma alta sensibilidade (96% a 100%) e especificidade (99,1% a 100%) do kit TPP comparado observação de cistos por exames de fezes para *E. histolytica/dispar* foram relatados (GARCIA, SHIMIZU e BERNARD, 2000; SHARP et al., 2001). Em outro estudo, embora a especificidade do kit de triagem tenha sido elevada (100%), a sensibilidade foi baixa (68,3%) em comparação com a do teste ProSpecTest (PILLAI e KAIN, 1999). Um estudo recente da Suécia comparou o teste TPP com o PCR e demonstrou uma baixa sensibilidade para ensaio TPP (LEIVA et al., 2006). A vantagem do método TPP é que ele pode ser realizado em cerca de 15 min com espécimes fecais humanas não fixadas frescos ou congelados.

Existe agora uma ampla variedade de métodos de PCR, visando diferentes genes, o que foram descritos para a detecção e diferenciação de três espécies de *Entamoeba*. Uma grande diversidade genética foi detectada na porção 18S rDNA de *E. histolytica* e *E. dispar* depois de iniciada a utilização desta região como um alvo para a diferenciação das duas espécies (CLARK e DIAMOND, 1991, 1992). O DNA extraído a partir de trofozoítos cultivados em laboratório e DNA recuperado diretamente de amostras de fezes positivas à microscopia utilizando os métodos manual e automatizado foram testados e os métodos de PCR provaram ser altamente sensíveis e específicos para a detecção de DNA de *Entamoeba* (CLARK e DIAMOND, 1993, 1997; TROLL, MARTI e WEISS, 1997; RAMOS et al., 2000; HECKENDORN et al., 2002; MORAN et al., 2005). Ensaio de PCR direcionados à região 18S rDNA são amplamente utilizados para o detecção e diferenciação de espécies de *Entamoeba*, uma vez que esses fragmentos estão presentes em cópias dentro de plasmídeos extracromossomais na ameba (BHATTACHARYA et al., 1989), sendo o 18S DNAr mais facilmente detectado em um fragmento de DNA de um gene de cópia única. O sucesso do uso de PCR no estudo da epidemiologia da infecção por *Entamoeba* foi primeiro relatado por Acuna-Soto et al. (1993). Eles usaram DNA extraído diretamente de fezes, evitando a necessidade de cultura de trofozoítos e os iniciadores foram utilizados para amplificar o DNA circular extracromossômico alvo. Este gene alvo foi subsequentemente utilizado por outros investigadores (AGUIRRE et al., 1995; BRITTEN et al., 1997). Este PCR, com detecção colorimétrica do produto alvo, também foi utilizado com o DNA extraído de amostras fecais, utilizando uma modificação do Kit QIAGEN (AGUIRRE et al., 1995;.

VERWEIJ et al., 2000). Os iniciadores para o gene do antígeno de 29 kDa / 30 kDa têm sido utilizados para distinguir entre espécies patogênicas e não-patogênicas de *Entamoeba*, utilizando-se o PCR convencional (TACHIBANA et al., 1991). Em laboratórios de pesquisa, este objetivo tem sido utilizado para análises de fezes de microscopia-positiva que foram cultivadas em laboratório (TACHIBANA et al, 2000;. PINHEIRO et al, 2004) bem como amostras fecais fixadas em formalina (RIVERA et al., 1996, 1998, 2006).

Outros alvos para PCR incluem genes codificadores de proteínas que apresentaram polimorfismo na região de codificação como o gene de proteína rica em serina de *E. histolytica* (SREPH) e o gene da quitinase (STANLEY et al., 1990; DE LA VEJA et al., 1997). SREPH como um alvo foi relatado para a amplificação de DNA recuperado a partir de culturas de laboratório e fezes positivas em microscopia com concentração de cistos por técnicas de gradiente de flutuação em sulfato de zinco (RAMOS et al., 2005). Um nested PCR de SREPH foi recentemente usado para investigar a diversidade de *E. histolytica* em população humana, usando DNA extraído a partir de fezes positivas em microscopia (AYEH-KUMI et al., 2001). PCR utilizando o gene de proteinase cisteína e os genes da actina como alvos também foi utilizado para estudar o epidemiologia da amebíase (FREITAS et al., 2004). Além disso, um ensaio baseado no gene da hemolisina PCRHLY6 de *E. histolytica* (PCR hemo) foi desenvolvido para a detecção de DNA de *E. histolytica* em amostras fecal e ALA e foi mostrado ter 100% sensibilidade e especificidade (ZINDROU et al., 2001). PCR para a detecção de DNA de *E. histolytica* a partir de amostras de abscesso hepático foi o primeiro a ser feito utilizando o gene que codifica antígeno de 30- kDa e 100% de sensibilidade foi relatado. Em outro estudo, a PCR realizada em amostras de fígado demonstrou apenas 33% sensibilidade para detectar a presença de *E. histolytica* utilizando iniciadores específicos para região 18S DNAr de *E. histolytica*, enquanto que o segundo par, específico para o gene do antígeno de 30 kDa (TACHIBANA et al., 1992), mostrou uma sensibilidade de 100% (ZENGZHU et al., 1999). A amplificação direta para a detecção de DNA de *E. histolytica* (sem a extração de DNA) de pus de ALA foi relatado usando 10 diferentes pares de iniciadores anteriormente publicados (utilizados para amplificação de *E. histolytica* a partir de fígado amostras de fezes (ZAMAN et al., 2000). Dos 10 diferentes pares de iniciadores testados, dois pares P1-P2 com alvo no DNA extracromossomal circular de *E. histolytica* (ACUNA-SOTO et al., 1993) e P11-P12 visando o gene do antígeno

de 30-kDa (TACHIBANA et al., 1992) obtiveram 100% de sensibilidade. Outro ensaio de PCR (hemo PCR), com base no gene da hemolisina HLY6 de *E. histolytica* foi analisado para amostras de abscesso hepático. A hemo-PCR deu um resultado positivo para 89% das amostras de ALA em comparação com 77% e 28% para o gene do antígeno de 30-kDa e 18S rDNA respectivamente (ZINDROU et al., 2001). A hemo-PCR foi desenvolvido para ser uma valiosa ferramenta de diagnóstico para identificação de *E. histolytica* no fígado e amostras fecais. Para a identificação de *E. moshkovskii* em espécimes fecais, um método de impressão digital foi primeiramente relatado por Haque et al. (1998). Subsequentemente, um PCR para a identificação de *E. moshkovskii* em amostras fecais foi desenvolvido como um nested PCR da região 18S DNAr, seguido por digestão de restrição de endonuclease (ALI et al., 2003). Este método tem uma alta sensibilidade e especificidade (100%) com DNA extraído diretamente a partir de amostras de fezes utilizando o kit de extração de fezes QIAGEN (FOTEDAR et al., 2007).

Os protocolos da PCR em tempo real têm sido publicados recentemente para identificação e diferenciação de *E. histolytica* e *E. dispar*. Estes incluem um ensaio de ciclo de luz utilizando sondas de hibridação para detectar a amplificação de 18S DNAr a partir de amostras fecais (BLESSMANN et al., 2002a; CALDERARO et al., 2006) e dois ensaios TaqMan, uma segmentação do fragmento 18S rDNA (VERWEIJ et al, 2003, 2004;.. KEBEBE et al, 2004) e um outro alvo de repetições episomais, utilizando DNA extraído de amostras fecais coletadas de primatas e humanos (VERWEIJ et al., 2003). Um banco molecular de PCR em tempo real com alvo em 18S rDNA de *E. histolytica* para uso em amostras fecais e ALA foi descrito (ROY et al., 2005). Outro ensaio em tempo real SYBR visando o 18S rDNA foi descrito por Qvarnström et al. (2005). As sequências selecionadas na maioria desses estudos em tempo real têm incluídos rDNA como o alvo para PCR. Uma recente avaliação de três ensaios de PCR em tempo real, focando na fraqueza e pontos fortes de cada ensaio e sua utilidade para a clínica diagnóstico laboratorial, foi publicado por Qvarnström et al. (2005). Este estudo deu destaque a grandes diferenças nos limites de detecção e desempenho do ensaio que foram observados entre os testes avaliados. Dois dos ensaios neste estudo não poderiam de forma confiável distinguir *E. histolytica* e *E. díspar* (BLESSMANN et al., 2003) e o ensaio TaqMan direcionamento repetições epissomais (VERWEIJ et al., 2003). UM ensaio multiplex em tempo real foi subsequentemente desenvolvido para detecção de

diferentes parasitas intestinais com 100% de sensibilidade e especificidade (VERWEIJ et al., 2004). Este ensaio permitiu a detecção de *E. histolytica*, *G. lamblia* e *C. parvum* e ofereceu a possibilidade da detecção de DNA em rotina de diagnóstico de infecções parasitárias intestinais. A implementação de tais ensaios multiplex e desenvolvimento de procedimentos automatizados de isolamento de DNA poderiam ter um tremendo impacto sobre parasitologia na rotina prática. Um PCR em tempo real para a detecção de *E. moshkovskii* em amostras clínicas ainda não foram relatados, desta forma mais pesquisas são, portanto, necessárias para desenvolver estes métodos para a detecção desta *Entamoeba*.

Recentemente, um novo método de amplificação de ácido nucléico denominado Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) tem sido desenvolvido (LIANG et al., 2009). A LAMP foi originalmente desenvolvida pela Notomi et al. (2000), Mori et al. (2001) e Nagamine et al. (2002) (Eiken Chemical Co., Ltd., Japão). Este método emprega uma DNA polimerase com atividade de quatro iniciadores que reconhecem seis sequências alvo. Este método amplifica DNA com alta especificidade, sensibilidade e rapidez sob condições isotérmicas. (60 a 65°C) em incubadoras simples, como uma banheira de água ou bloco de calor são adequados para a amplificação do DNA (NOTOMI et al., 2000). Além disso, uma grande quantidade de precipitado branco de pirofosfato de magnésio é produzida como um subproduto, que permite um julgamento de amplificação a olho nu (MORI et al., 2001). Levando-se em conta estas vantagens, o ensaio LAMP poderia se tornar uma valiosa ferramenta de diagnóstico nos países em desenvolvimento ou laboratórios hospitalares. Com o ensaio LAMP, *E. histolytica* em amostras de fezes pode ser detectada rapidamente sob a luz ultra violeta a olho nu, sem qualquer outro equipamento sofisticado (MORI et al., 2001), além disso, a LAMP supera a microscopia em sua capacidade de discriminar *E. histolytica* e *E. díspar* e *E. moshkovskii*. Destes kits comerciais assim como o kit TechLab II detectam os antígenos de *E. histolytica*, eles não foram comparados com o ensaio LAMP que é baseado em detecção de DNA. O ensaio LAMP desenvolvido por Liang et al (2009) tem níveis de sensibilidade e especificidade semelhantes aos de nested PCR e pode ser útil para a detecção clínica e vigilância ativa de *E. histolytica* em países onde a amebíase é endêmica. O ensaio LAMP requer mínima instalações laboratoriais e pode diferenciar amostras de DNA de *E. histolytica* e *E. díspar*. Contudo, em

comparação aos requisitos para a realização de nested PCR, a simplicidade e acessibilidade do ensaio LAMP permite a fácil identificação de *E. histolytica*.

#### 4.7 BIOLOGIA MOLECULAR

A biologia molecular é uma ferramenta valiosa dos cientistas, podendo fornecer aos epidemiologistas informações muito além das oferecidas pela microscopia tradicional, pela cultura e imunologia, auxiliando na vigilância de agentes infecciosos e na determinação das fontes de infecção (THOMPSON et al., 1998; MORGAN et al., 2000).

Os métodos moleculares foram desenvolvidos para detecção dos parasitas, visando superar as limitações encontradas nos métodos microscópicos convencionais (CARVALHO-ALMEIDA, 2004).

A identificação e caracterização genotípica, por técnica de biologia molecular, das amostras de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. e *Entamoeba* spp. isoladas a partir de material fecal, é ferramenta fundamental para se entender melhor o papel do homem e dos animais como reservatórios e fontes de infecção humana, bem como identificar outras fontes de infecção, como a hídrica, por exemplo (CARVALHO-ALMEIDA, 2004).

Métodos moleculares têm sido cada vez mais utilizados para proporcionar alta acurácia e especificidade na detecção dos oocistos, ovos e cistos em amostras clínicas e ambientais, para definir a posição taxonômica das várias espécies de parasitos (HIGGINS et al., 2001; THOMPSON e CHALMERS, 2002, CHALMERS e DAVIES, 2010).

##### 4.7.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O problema da baixa sensibilidade das reações de hibridização de DNA do parasita presente na amostra, foi melhorado por um método capaz de amplificar milhares de vezes uma molécula de DNA alvo, com o uso de uma enzima, a polimerase. Na PCR, regiões específicas do DNA de interesse são amplificadas

enzimaticamente, assim, um segmento específico de DNA de fita dupla ou de fita simples, pode ser amplificado, através de sucessivos ciclos. Com a utilização da transcriptase reversa o RNA também pode ser amplificado (CARVALHO-ALMEIDA, 2004).

A técnica da PCR consiste basicamente em fazer cópias de uma sequência específica do DNA de um organismo *in vitro*, utilizando para isso, os elementos básicos de replicação natural do DNA (POWLEDGE, 2004). O resultado desta amplificação é facilmente visualizado através da eletroforese em gel de agarose (BRODY e KERN, 2004).

A especificidade e sensibilidade da PCR são ferramentas úteis para detecção e caracterização de grande variedade de patógenos. Em termos práticos, essas técnicas podem ser usadas como simples testes de “presença/ausência” de determinados agentes. Em adição à detecção do parasito, a PCR pode ser usada para determinação da estrutura populacional e na caracterização de organismos que não podem ser cultivados ou purificados, como é o caso dos parasitos intracelulares (MONIS et al., 2002). Diversificados protocolos têm sido descritos no processamento dos parasitas para obtenção de amostra de DNA apropriada para a PCR.

O processo inicial geralmente envolve a lise do parasita por choque térmico (congelamento/aquecimento), por fervura ou por meios químicos. O passo seguinte consiste na remoção dos inibidores da PCR (SINGH, 1997). Os métodos da PCR podem não somente ser aplicados a pequeno número de oocistos e cistos, como também, amostras fecal e ambiental podem ser analisadas diretamente sem a necessidade de isolar o parasita intactos (WIDMER et al., 2002).

As vantagens da PCR incluem alta sensibilidade, análise rápida de grande número de amostras, relativamente baixo custo, detecção de múltiplos patógenos, e capacidade de discriminar entre espécie e cepa, se houver *primers* específicos (ROCHELLE et al., 1997).

#### 4.7.1.1 Nested PCR

A técnica de Nested PCR consiste em utilizar os produtos da reação da PCR em uma segunda reação (SAMBROOK et al., 2001). Dessa forma, são utilizados os produtos da amplificação realizada pelos primeiros iniciadores, como um molde para



uma segunda amplificação, realizada com outro par de iniciadores que se anelam com sequências internas ao primeiro amplificado. A utilização desta técnica no diagnóstico de alguns protozoários é recomendada, pois aumenta ainda mais a sensibilidade da PCR, conseguindo detectar o parasita mesmo em amostras que contém quantidade muito pequena destes (SANTÍN et al., 2004).

#### 4.7.1.2 Multiplex PCR

A Multiplex PCR consiste na utilização de mais de um par de iniciadores em uma mesma PCR. Desta forma, vários segmentos de DNA alvo são amplificados simultaneamente, economizando tempo, diminuindo gastos e sendo capaz de detectar mais de uma espécie no caso de infecções mistas, pois cada par de iniciador vai amplificar uma sequência específica de cada espécie (SAMBROOK et al., 2001). Entretanto, esta técnica ainda está sendo aperfeiçoada no diagnóstico de parasitos devido a sua dificuldade de aplicação, uma vez que exige que todos os iniciadores tenham temperaturas de anelamento aproximadas, não interajam entre si e que os fragmentos amplificados tenham tamanhos próximos (SANTÍN e ZARLENGA, 2009).

#### 4.7.1.3 PCR-RFLP

A PCR-RFLP utiliza enzimas específicas na reação da PCR, que são capazes de clivar uma sequência de nucleotídeos em determinados pontos e a partir destas clivagens, a espécie pode ser identificada em eletroforese em gel de agarose (SAMBROOK et al., 2001; SPANO et al., 1997). Uma das grandes vantagens da PCR-RFLP, é a capacidade de diferenciar espécies sem a necessidade do sequenciamento (SPANO et al., 1997). Por outro lado, ainda é incapaz de diferenciar algumas espécies, por possuírem o mesmo sítio de restrição e permanecendo, portanto, com o mesmo padrão no gel (TROTZ-WILLIAMS et al., 2006).

#### 4.7.2 Sequenciamento

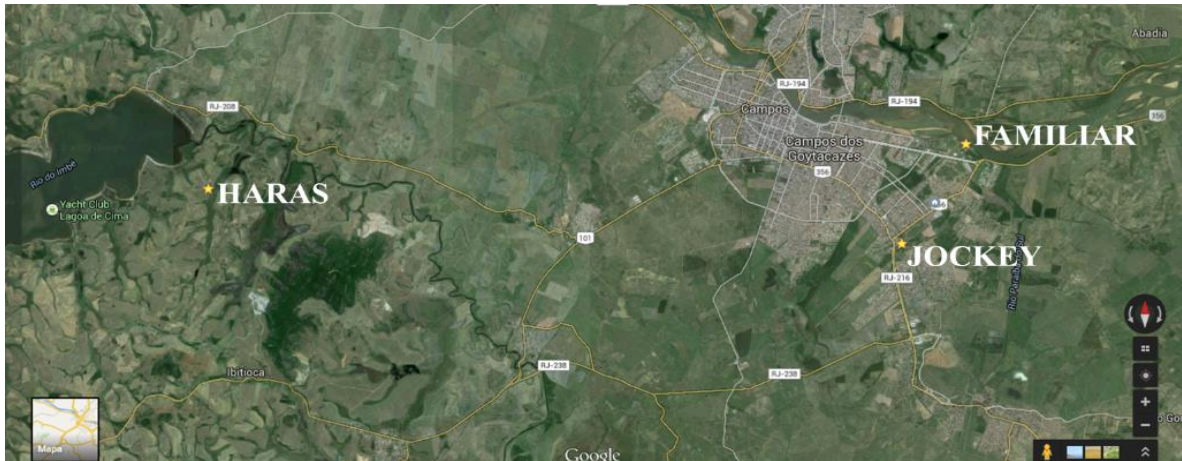
O sequenciamento tem como objetivo determinar a ordem exata dos nucleotídeos de um determinado segmento de DNA e vem sendo utilizado no diagnóstico da espécie envolvida na infecção (SMITH e NICHOLS, 2010). Antes de iniciar as etapas do sequenciamento, as amostras, que já foram previamente submetidas à PCR, são purificadas. Este procedimento é de extrema importância, pois remove os dNTPs e iniciadores que restaram das reações anteriores, e que poderiam causar interferência nas reações seguintes (SAMBROOK et al., 2001). As amostras são então submetidas a uma nova PCR com formulação específica, sendo que os iniciadores são utilizados em reações independentes para que as duas sequências obtidas possam ser posteriormente alinhadas, visto que são complementares, aumentando dessa forma a acurácia do resultado final (SAMBROOK et al., 2001). A sequência obtida poderá ser submetida ao GenBank (Genetic Sequence Data Bank) utilizando uma ferramenta de busca de alinhamentos de sequências existentes o “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) e a identificação da espécie em questão é realizada em apenas alguns segundos (ALTSCHUL et al., 1997).

### 5. MATERIAL E MÉTODOS

#### 5.1 LOCAL DE EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO

As coletas de fezes dos animais foram realizadas em propriedades rurais localizadas na cidade de Campos dos Goytacazes-RJ. As propriedades foram selecionadas por conveniência de modo que foram distinguidas três características diferentes, uma é um haras tradicional onde os animais ficam a pasto e dormem em baias (HARAS), outra do tipo criação familiar, neste caso os animais são criados em comunidades da periferia sem infraestrutura e em cocheiras improvisadas (FAMILIAR) e uma terceira onde os animais são criados em cocheiras apropriadas no Jockey Clube da cidade (JOCKEY); todas localizadas no perímetro urbano da cidade de Campos dos Goytacazes – RJ (FIGURA 1). Os exames laboratoriais foram realizados no Núcleo de

Pesquisas Avançadas em Parasitologia (NUPAP) do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense - Darcy Ribeiro (HV-UENF).



**Figura 1.** Imagem de satélite de uma região do município de Campos dos Goytacazes – RJ onde estão situadas as 3 propriedades selecionadas para estudo (Fonte: Google Maps, acesso em 04/2015).

## 5.2 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizadas amostras fecais de 50 equinos, 17 do HARAS, 20 do JOCKEY e 13 na FAMILIAR. Estas foram coletadas diretamente da ampola retal com o auxílio de sacos plásticos identificados e acondicionados em caixas isotérmicas a 4°C para transporte até o laboratório. As amostras foram processadas em até 24 horas, contadas a partir da coleta.

## 5.3 ISOLAMENTO DOS PROTOZOÁRIOS A PARTIR DE AMOSTRAS FECAIS

Para concentração dos protozoários nas fezes dos animais foi utilizada a técnica de centrífugo-flutuação com solução hiper saturada de sacarose (FIUZA et al., 2008), como descrito a seguir: 15g de cada amostra de fezes foram transferidas para tubos cônicos de 50ml e em seguida, foi adicionada quantidade suficiente de água destilada até

alcançar um volume de 50ml. Os tubos foram deixados em repouso por 20min e após agitação, filtrados em malha de 45 $\mu$ m. Os filtrados foram transferidos para um novo tubo de 50ml, no qual também foi adicionada quantidade suficiente de água destilada até completar 50ml de volume final. Estes tubos foram centrifugados por 10 minutos a 2500rpm e o sobrenadante foi descartado logo após. O sedimento foi então ressuspensionado em água destilada até alcançar um volume de 25ml e logo em seguida foram adicionados 25ml de solução de sacarose (1,1g/ml) e depois de realizada a homogeneização da solução, os tubos foram novamente centrifugados a 1000rpm por 20min à 4°C. Foram aspirados 4ml do sobrenadante e pipetados em tubos cônicos de 15ml, onde foi adicionado 11ml de água destilada para que fosse obtido o volume final de 15ml em cada tubo. Esta solução foi centrifugada a 2500rpm por 10min com o sobrenadante descartado logo em seguida. O sedimento foi então ressuspensionado em 500 $\mu$ l de água destilada e transferido para um tubo Eppendorf, onde foi congelado para posterior extração do DNA.

## 5.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

### 5.4.1. Extração do DNA

Foi utilizado o DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen®) com reagentes fornecidos pela própria empresa com ligeiras modificações no protocolo (SANTÍN et al., 2004). Após descongelamento das amostras, 50 $\mu$ l foram misturadas a 180 $\mu$ l de tampão ATL e completamente homogeneizadas em vortex. Após esta etapa, foram adicionados 20 $\mu$ l de proteinase K (20mg/ml) e novamente a mistura foi homogeneizada. Os tubos foram então incubados overnight a 55°C e foi então adicionado 200 $\mu$ l de tampão AL. O protocolo restante foi seguido de acordo com as orientações do fabricante, com apenas uma exceção: para se aumentar a quantidade de DNA recuperado, o ácido nucléico foi eluído em 100 $\mu$ l de tampão AE.

#### 5.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Todas as amostras foram examinadas pela PCR para diagnóstico de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* e *Entamoeba* spp, com iniciadores específicos em termociclador Eppendorf® Mastercycler® Personal.

##### 5.4.2.1 *Cryptosporidium* spp.

Foi utilizado o protocolo de nested PCR, com amplificação em duas etapas de um fragmento de 830 pb do gene 18S rRNA. Para amplificação primária foram utilizados os seguintes iniciadores externos: CRYPTOOF (5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3') e CRYPTOR (5'-CCCATTCCTTCGAAACAGGA-3'); e para a amplificação secundária, os iniciadores internos: AL1598 (5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3') e AL3032 (5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3') (XIAO et al., 1999).

O procedimento de amplificação foi realizado com os seguintes componentes para a amplificação primária: tampão PCR 1x; MgCl<sub>2</sub> (3mM); dNTP (0,2mM), Taq (2,5U) (Qbiogene®); BSA (2,5µl-0,1g/10ml); 1µM de cada um dos iniciadores e 5µl de DNA em um volume final de 50µl. A amplificação secundária conteve: tampão PCR 1x; MgCl<sub>2</sub> (1,5mM); dNTP (0,2mM); Taq (2,5U), BSA (2,5µl-0,1g/10ml); 1µM de cada um dos iniciadores e 3µl do produto da primeira reação, em um volume final de 50µl.

Para a amplificação primária foram realizados os seguintes ciclos no termociclador: 94°C/3 min; 35 ciclos de 94°C/45s, 59°C/45s e 72°C/1 min; e um último ciclo de 72°C/7 min. Para a amplificação secundária: 94°C/3 min; 40 ciclos de 94°C/30s, 58°C/90s e 72°C/2 min; e um último ciclo de 72°C/7 min.

##### 5.4.2.2. *Giardia* spp.

Um fragmento de cerca de 292pb da SSU-rDNA foi amplificado em duas reações de PCR (HOPKINS et al 1997).

Para a primeira reação de amplificação em PCR foram utilizados, em um volume final de 50µl: tampão PCR 1x; MgCl<sub>2</sub> (1,5mM); dNTP (0,2mM); Taq (2 U); Dimetilsulfóxido (DMSO) (2,5µl) e 0,5µl de cada iniciador: para reação interna RH-11 (5'-CATCCGGTTCGATCCTGCC-3') e RH-4 (5'- AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG-3') e

reação externa com os primers Gia-F (5'- GACGCTCTCCCCGAC-3') e Gia-R (5'- CTGCGTCACGCTGCTGCTC-3') (Read et al. 2002). Um total de 35 ciclos, cada um consistindo de 96°C/45s, 58°C/30s e 72°C/45s foi realizado. Uma etapa inicial de 96°C/2 min e uma extensão final de 72°C/4 min também foram incluídas.

#### 5.4.2.3. *Entamoeba* spp.

Foram utilizados os iniciadores específicos para *Entamoeba* spp. ENTAM1 (5'- GTTGATCCTGCCAGTATTATATG-3') e ENTAM2 (5'-CACTAT TGGAGCTGGAATTAC-3') (VERWEIJ 2001), que amplificam fragmentos de 550pb, em uma única reação de amplificação.

Para esta reação, foram utilizados MgCl<sub>2</sub> (1,5mM); dNTP (250µM); Taq (1,25 U); tampão Taq 1x; 40pmol de cada iniciador e 10µl de DNA em um volume final de 50µl. A reação de amplificação foi realizada em 30 ciclos de 94°C/30s; 55°C/30s e 72°C/30s.

#### 5.4.3 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR e nested PCR foram analisados em corrida de eletroforese de gel de agarose a 1%, corado com gel red imerso em tampão TAE 1X em cuba horizontal de eletroforese Sub-cell® GT Bio-Rad em fonte Power Pac Basic – Bio – Rad.

A visualização das bandas foi realizada em fotodocumentadora Gel Logic 212 Pro - Analítica através do programa Carestream – Molecular Imaging Software T e os tamanhos dos fragmentos comparados com marcador molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen®) com controles positivo e negativo. Os controles utilizados são provenientes de banco de controles do laboratório.

### 5.5. ESTATÍSTICA

Para verificar a frequência e os fatores de risco (Risco relativo – Rr) relacionados entre as idades e propriedades foi utilizado o Teste de Fisher, com

intervalo de confiança de 95%. Todos os cálculos foram feitos com o auxílio do software SAEG (Sistema para Análise Estatística - versão 9.1).

## 6. RESULTADOS

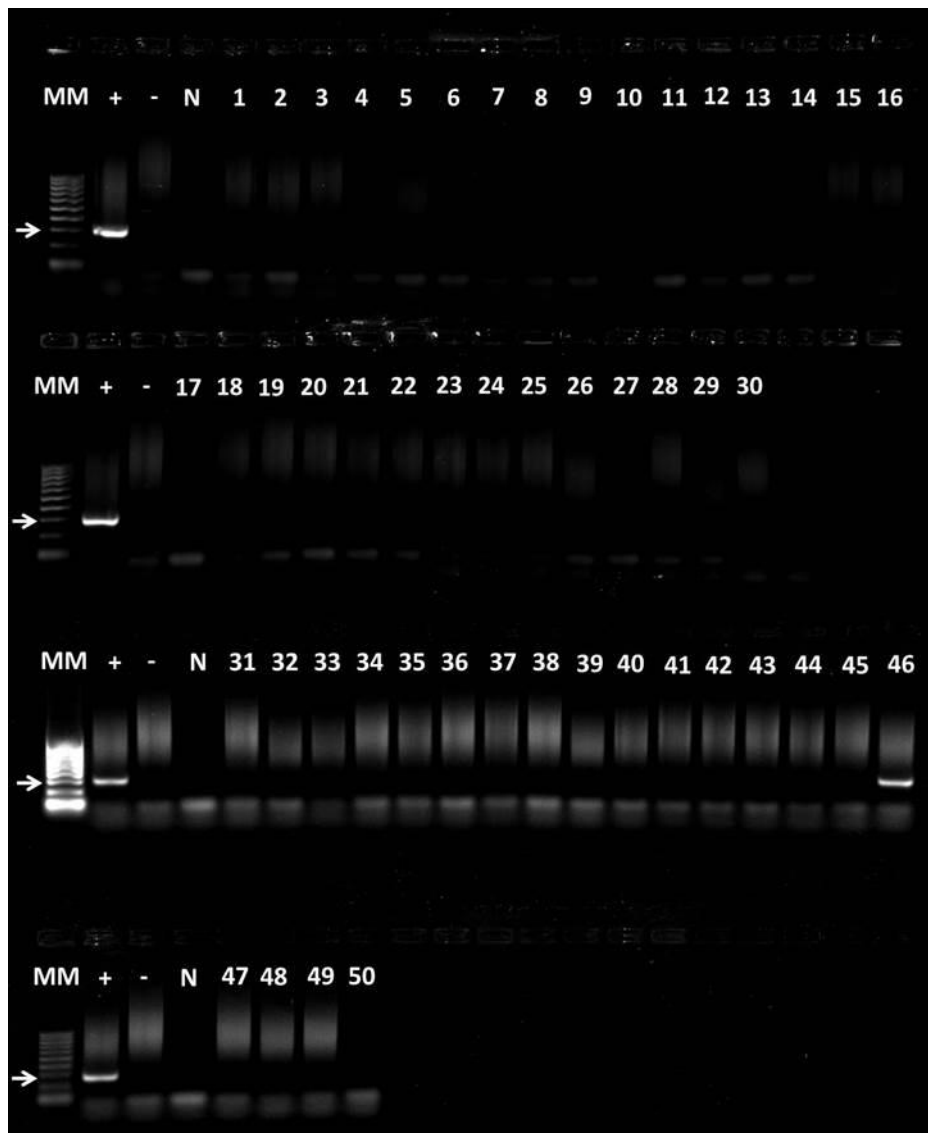
Dos 50 animais examinados 22 estavam positivos para patógenos entéricos determinando uma frequência de 44% (Tabela1), no entanto, em um animal da JOQUEI foi detectado o DNA de *Giardia* spp. em suas fezes pela técnica de n-PCR o que equivale a uma frequência de 02% (Figura 2 e Tabela 1), também foram diagnosticados, pela mesma técnica, dois animais positivos para *Cryptosporidium* spp., frequência de 4%, ambos da propriedade FAMILIAR (Figura 3 e tabela 1) e 19 animais infectados por *Entamoeba* spp., frequência de 38%, onde destes oito são da FAMILIAR, nove da JOCKEY e dois da HARAS (Figura4, Tabela 2), no entanto, para *Entamoeba* spp. o diagnóstico foi através da amplificação de fragmento de DNA do parasita pela PCR (Tabela 1).

Devido ao número reduzido de amostras positivas para protozoários do gênero *Cryptosporidium* e *Giardia*, não foi possível a determinação de diferença estatística da frequência destes patógenos em relação à idade dos animais, no entanto, este parâmetro analisado para frequência de *Entamoeba* spp., não indicou diferença estatística ( $P=0,1841$ ) entre animais jovens (potros) com idade menor ou igual a dois anos e os equinos adultos com idade acima de dois anos (Tabela 3). Para este mesmo protozoário foi observado que a propriedade HARAS tem significativa menor frequência ( $P=0,0045$ ) que as propriedades FAMILIAR e JOCKEY, não havendo diferença estatística entre estas duas (Tabela 4).

Foi determinado o Rr da infecção por *Entamoeba* spp. pelos equinos das propriedades FAMILIAR e JOCKEY comparando ao da propriedade HARAS e verificou-se que a propriedade FAMILIAR tem cinco vezes mais chance de ter animais infectados ( $P=0,069$  e  $Rr=5,231$ ) do que a propriedade HARAS (Tabela 5) e que a propriedade JOCKEY tem três vezes mais chance dos animais apresentarem o protozoário nas fezes ( $P=0,365$  e  $Rr= 3,825$ ) do que a propriedade HARAS (Tabela 6).

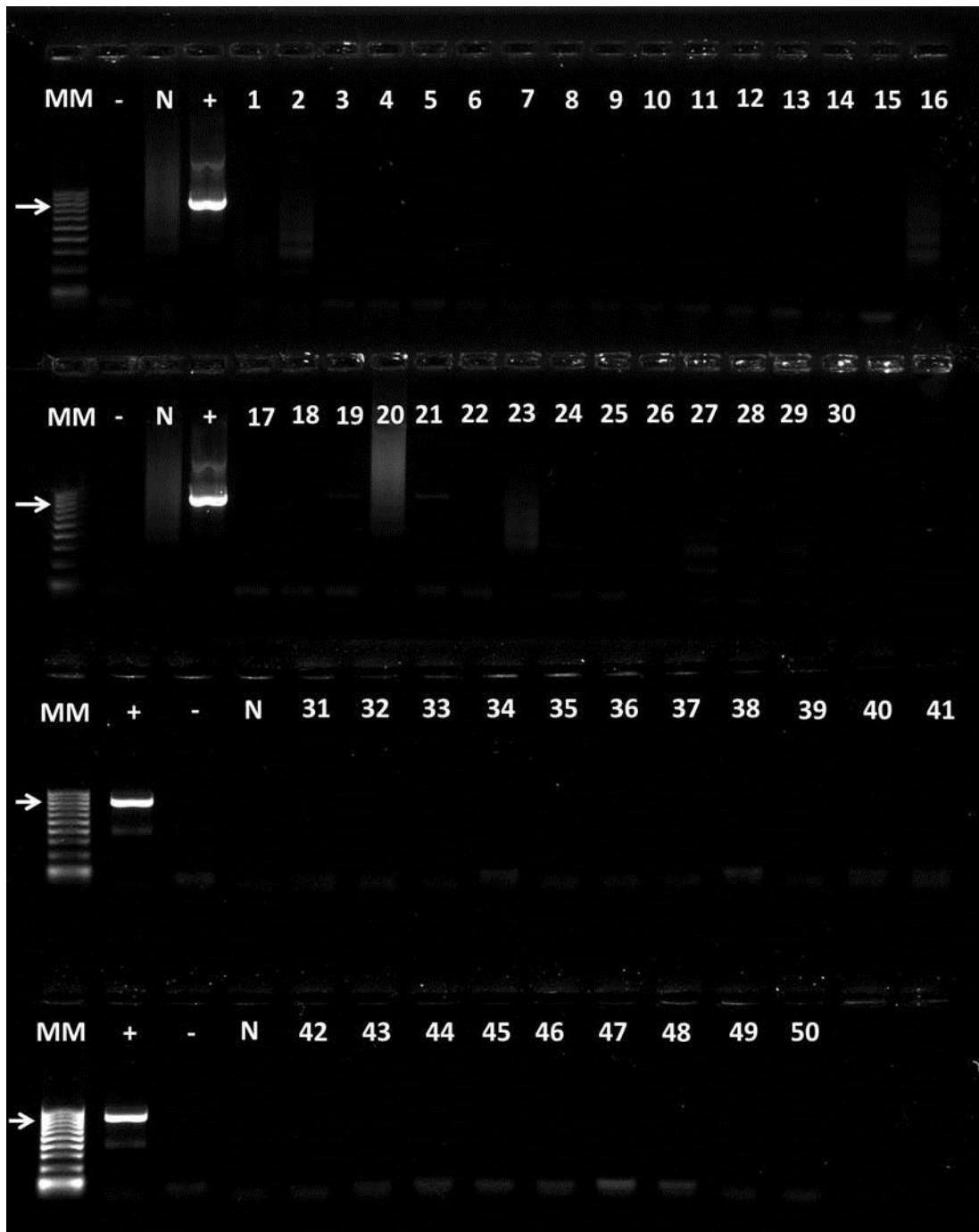
**Tabela 1-** Diagnóstico de patógenos entéricos emergentes e reemergentes em equinos de propriedades localizadas em áreas urbanas da cidade de Campos dos Goytacazes-RJ, através da técnica da “Polymerase Chain Reaction” (PCR) “nested Polymerase Chain Reaction” (n-PCR).

ESPÉCIMES	Amostra/positivo	Técnica	FREQUÊNCIA (%)
<b>PROTOZOÁRIOS</b>			
<i>Entamoeba</i> spp.	50/19	PCR	38
<i>Giardia</i> spp.	50/01	n-PCR	02
<i>Cryptosporidium</i> spp.	50/02	n-PCR	04
<b>TOTAL</b>	<b>50/22</b>	<b>PCR/n-PCR</b>	<b>44</b>

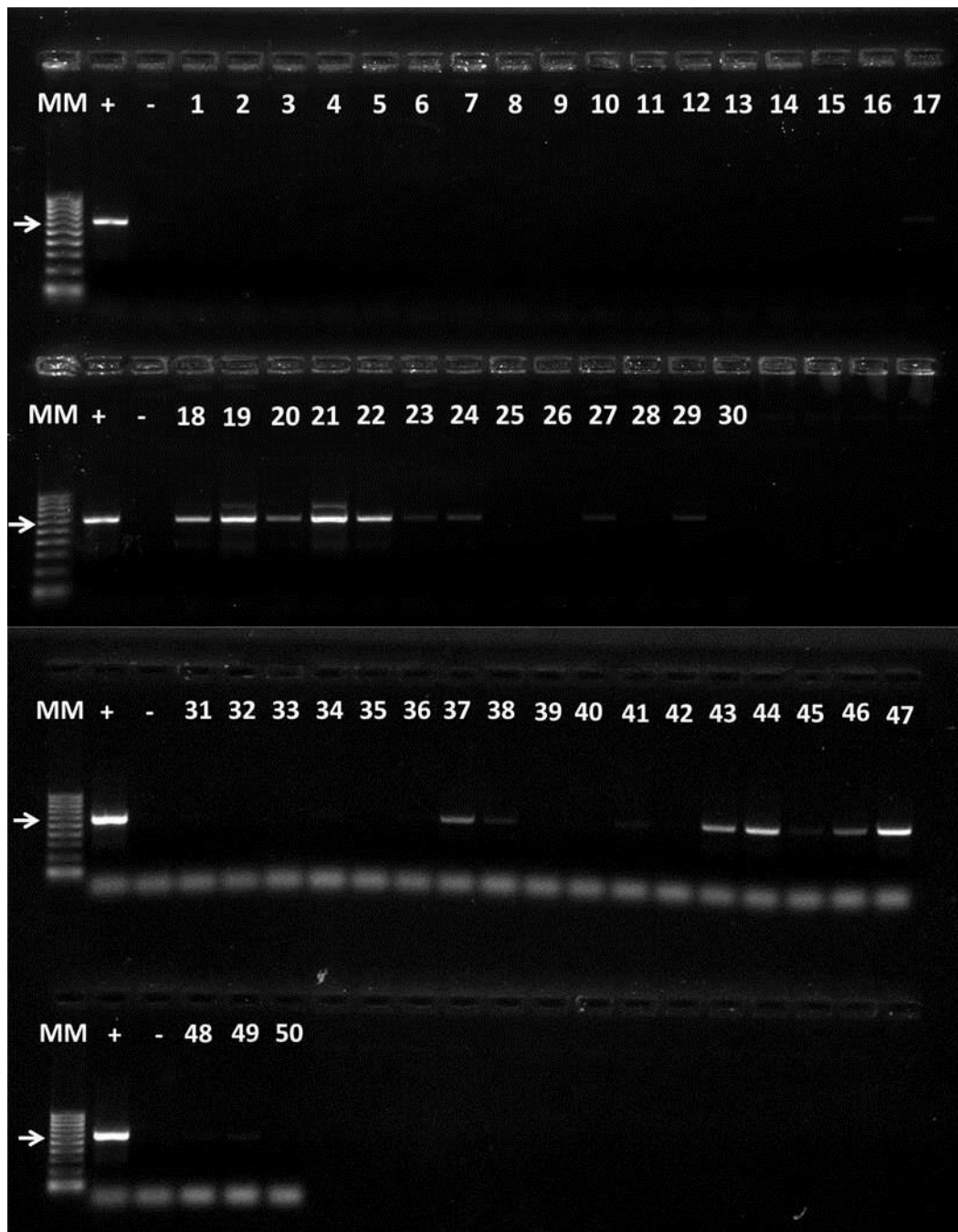


**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose (1%) com os produtos da PCR do gene 18S rRNA de cistos de *Giardia* spp.. Marcador de peso molecular (MM); controle positivo (+); controle negativo (-); controle (nested) negativo (N). A seta indica a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 300 pb.





**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose (1%) com os produtos da nested PCR do gene 18S rRNA de oocistos de *Cryptosporidium* spp.. Marcador de peso molecular (MM); controle negativo (-); controle (nested) negativo (N); controle positivo (+) e amostras 19 e 21 positivas. A seta indica a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 800 pb.



**Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose (1%) com os produtos da PCR do gene 18S rRNA de cistos de *Entamoeba* spp.. Marcador de peso molecular (MM); controle positivo (+); controle negativo (-) e amostras 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 27 e 29 positivas. A seta indica a posição relativa de um produto de PCR de aproximadamente 550 pb.

**Tabela 2.** Distribuição do número de amostras diagnosticadas por propriedades e patógenos entéricos emergentes e reemergentes de equinos criados em áreas urbanas da cidade de Campos dos Goytacazes-RJ, através da técnica da “Polymerase Chain Reaction” (PCR) “nested Polymerase Chain Reaction” (n-PCR).

PROPRIEDADE	<i>Giardia</i> (n-PCR)	<i>Cryptosporidium</i> (n-PCR)	<i>Entamoeba</i> (PCR)
FAMILIAR <sup>a</sup>	N	2	8
JOCKEY <sup>b</sup>	1	N	9
HARAS <sup>c</sup>	N	N	2
<b>TOTAL</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>19</b>

<sup>a</sup> Animais criados em comunidades da periferia sem infraestrutura.

<sup>b</sup> Animais criados em cocheiras apropriadas.

<sup>c</sup> Animais ficam a pasto e dormem em baias.

<sup>d</sup> Amostras negativas.

**Tabela 3.** Frequência de Infecção por *Entamoeba* spp. em equinos criados na periferia da cidade de Campos dos Goytacazes-RJ de acordo com a idade. Exame de amostras fecais através da técnica da “Polymerase Chain Reaction” (PCR).

Variáveis	Animais			Valor de P <sup>a</sup>
	Positiva	Negativa	Total	
Jovem (≤ 2 anos)	04 (8%)	02 (4%)	06 (12%)	0,1841
Adulto (>2 anos)	15 (30%)	29 (58%)	44 (88%)	
<b>Total</b>	<b>19 (38%)</b>	<b>31 (62%)</b>	<b>50 (100%)</b>	

<sup>a</sup> Para o Teste de Fisher e Intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 4.** Frequências comparativas da infecção por *Entamoeba* spp. em equinos de três diferentes propriedades da periferia da cidade de Campos dos Goytacazes-RJ. Exame de amostras fecais através da técnica da “Polymerase Chain Reaction” (PCR).

Variáveis	Animais			Teste ( $\chi^2$ ) <sup>a</sup>	Valor de P
	Positiva	Negativa	Total		
FAMILIAR <sup>b</sup>	08 (16%)	05 (10%)	13 (26%)	A	0,0045
JOCKEY <sup>c</sup>	09 (18%)	11 (22%)	20 (40%)	A	
HARAS <sup>d</sup>	02 (04%)	15 (30%)	17 (34%)	B	
<b>Total</b>	<b>19 (38%)</b>	<b>31 (62%)</b>	<b>50 (100%)</b>		

<sup>a</sup> Letras iguais na coluna não difere significativamente pelo Teste de Fisher e Intervalo de confiança de 95%.

<sup>b</sup> Animais criados em comunidades da periferia sem infraestrutura.

<sup>c</sup> Animais criados em cocheira apropriadas.

<sup>d</sup> Animais ficam a pasto e dormem em baias.

**Tabela 5.** Risco relativo (Rr) da infecção por *Entamoeba* spp. em equinos de duas diferentes propriedades da periferia da cidade de Campos dos Goytacazes-RJ. Exame de amostras fecais através da técnica da “Polymerase Chain Reaction” (PCR).

Variáveis	Animais			Valor de P <sup>a</sup>	(Rr)
	Positiva	Negativa	Total		
FAMILIAR <sup>b</sup>	08 (27%)	05 (17%)	13 (43%)		
HARAS <sup>c</sup>	02 (07%)	15 (50%)	17 (57%)	0,0069	5,231
<b>Total</b>	<b>10 (33%)</b>	<b>20 (67%)</b>	<b>30 (100%)</b>		

<sup>a</sup> Para o Teste de Fisher e intervalo de confiança de 95%.

<sup>b</sup> Animais criados em comunidades da periferia sem infraestrutura.

<sup>c</sup> Animais criados em cocheira apropriadas.

**Tabela 6.** Risco relativo (Rr) da infecção por *Entamoeba* spp. em equinos de duas diferentes propriedades da periferia da cidade de Campos dos Goytacazes-RJ. Exame de amostras fecais através da técnica da “Polymerase Chain Reaction” (PCR).

Variáveis	Animais			Valor de P <sup>a</sup>	(Rr)
	Positiva	Negativa	Total		
JOCKEY <sup>b</sup>	09 (24%)	11 (30%)	20 (54%)		
HARAS <sup>c</sup>	2 (05%)	15 (41%)	17 (46%)	0,0365	3,825
<b>Total</b>	<b>11 (30%)</b>	<b>26 (70%)</b>	<b>37 (100%)</b>		

<sup>a</sup> Para o Teste de Fisher e intervalo de confiança de 95%.

<sup>b</sup> Animais criados em comunidades da periferia sem infraestrutura.

<sup>c</sup> Animais criados em cocheira apropriadas.

## 7. DISCUSSÃO

No município de Campos dos Goytacazes, RJ os trabalhos de identificação de enteropatógenos em animais de produção são escassos, ressaltando que são grandes responsáveis por perdas econômicas e principalmente disseminadores de zoonoses. Kostopoulou et al. (2015), mostraram que a excreção de *Cryptosporidium* e *Giardia* são comuns em equinos e que existem variações entre a prevalência para potros e adultos. Estes pesquisadores citam ainda que diferenças na ocorrência podem estar relacionadas aos métodos de estudo que podem englobar variáveis

como número limitado de animais além das propriedades em estudo, bem como liberação intermitente de cistos e oocistos e ainda a técnica de diagnóstico utilizada.

Com relação ao impacto destas infecções na saúde dos equinos, estes dados ainda estão indefinidos, porque, diferentemente do que ocorre com ruminantes, onde as infecções causam atraso no crescimento e diarreia, em equinos ainda não está estabelecida uma relação entre a presença de parasitos e sintomas clínicos (KOSTOPOULOU et al., 2015). Nossos resultados concordam com estes estudos, uma vez que nenhum dos animais investigados apresentavam clínica para doenças gastrintestinais e com relação à idade, este parâmetro analisado para frequência de *Entamoeba* spp., não indicou diferença estatística ( $P=0,1841$ ) entre animais jovens (potros) com idade menor ou igual a dois anos.

Ferraro et al. (2008), enfatizam que a falta de monitoramento parasitológico e de tratamento rotineiro adequado em cavalos, faz com que estes animais apresentem altas taxas de infecção parasitária, comprometendo significativamente o desempenho, além de contribuir na transmissão destas doenças. Nos cavalos analisados em nossa pesquisa, 22 estavam positivos para protozoários entéricos, determinando uma frequência de 44%, concordando assim com os pesquisadores supracitados, na necessidade de se monitorar equinos que vivem em contato com o homem e outras espécies domesticadas.

Dentre os protozoários investigados, frequência de 4% para *Cryptosporidium* spp., foi identificada em uma propriedade classificada como familiar, concordando com Ludwig e Marques (2008), que descrevem que a presença de oocistos deste coccídio nas amostras fecais de equinos ratifica que estes animais fazem parte da cadeia epidemiológica deste importante protozoário e podem contribuir, juntamente com os oocistos encontrados na água, para a disseminação e contaminação ambiental.

Gutiérrez-Cisneros et al. (2011) apesar de trabalharem com as técnicas de microscopia convencionais, utilizam a PCR como ferramenta de confirmação de outros métodos de detecção de espécies de *Cryptosporidium*. Desta forma não utilizamos a microscopia como técnica de diagnóstico e sim diretamente a PCR e nested PCR, visando melhor treinamento e diagnóstico mais preciso. No entanto, de acordo com Del Coco et al. (2009), ainda que as técnicas moleculares sejam úteis na epidemiologia e na taxonomia para espécies de *Cryptosporidium*, não se deve

desprezar a microscopia ou os ensaios imunobiológicos no diagnóstico de rotina da infecção.

Pela técnica de n-PCR, foi detectada uma frequência de 2,0% de *Giardia* spp. em local caracterizado pela criação dos animais em cocheiras apropriadas no Jockey Clube da cidade, porém neste local há uma grande densidade populacional de humanos e outros animais domésticos além de baixa infraestrutura associada à captação de água e direcionamento dos dejetos produzidos, concordando com Leib e Zajac, (1999) que citam a transmissão de giardíases por cistos que podem ser ingeridos através da água e de alimentos contaminados ou ainda pela transmissão direta, especialmente em áreas em que os animais que se encontram em aglomeração. Reforça esta hipótese de circulação deste protozoário os estudos realizados por Traub et al. (2009), em ambientes caracterizados pela promiscuidade entre humanos e animais, por acesso limitado à água potável e por higiene escassa, que têm apoiado a existência de ciclos de transmissão de *Giardia* spp. entre humanos e cães na Ásia bem como os estudos de Wegayehu et al. (2013), que apontaram a transmissão entre seres humanos e gado na Índia e Etiópia, o que permite inferir que em nosso estudo, a cadeia de transmissão de *Giardia* spp. entre humanos e equinos é possível.

Para *Entamoeba* spp., foi utilizada a técnica da PCR simples, sem utilizar primers específicos para espécie, o que não nos permitiu inferir se os equinos são hospedeiros definitivos ou se estão carregando espécies como hospedeiros transportadores ou paratêmicos ou ainda se exercem função de reservatórios. Desta forma estudos com sequenciamento do DNA isolado devem ser feitos ou ainda utilizar primers específicos para distinção das espécies circulantes nos equinos estudados, como no estudo de Nazemalhosseini Mojarad et al. (2010), que de 3.825 amostras de fezes humanas examinadas utilizando ensaios de PCR simples, 3,5% foram relatados como positivo para *E. histolytica*, 91,4% para *E. dispar* e 3,5% para *E. moshkovskii*. Possivelmente em nossos estudos estão circulando estas mesmas espécies uma vez que os animais encontravam-se em estreito convívio com humanos e seus dejetos. Reforça nossa hipótese os achados de Barwick, et al. (2002), que mostram que em países desenvolvidos, os surtos de infecção por *E. histolytica* podem ser causados por abastecimento de água contaminada por esgoto. Em nossas pesquisas, a maior quantidade de animais positivos foi para *Entamoeba* spp., ou seja, uma frequência de 38% e os locais com maior detecção foram

propriedades classificadas como FAMILIAR e JOCKEY, que são propriedades com alta aglomeração de animais e humanos e baixa infraestrutura para captação de água e saneamento básico; desta maneira, podemos utilizar estes dados como referência para detecção de possível contaminação ambiental e áreas com potencial para surtos de amebíase.

Com relação ao risco relativo de se contrair *Entamoeba* spp., verificou-se que a propriedade FAMILIAR revela estatisticamente chance cinco vezes maior de apresentar animais infectados do que a propriedade HARAS e que a propriedade JOCKEY tem três vezes mais chance dos animais apresentarem os protozoários nas fezes do que a propriedade HARAS. Embora estatisticamente fosse observado que a propriedade HARAS possui um fator de proteção para as infecções que pode ser pela dispersão dos cistos e menor promiscuidade entre animais, nós concordamos mais com Veronesi (1997), que cita que a alta prevalência de detecção de oocistos ocorre em regiões onde o saneamento básico é inadequado e o abastecimento de água é precário como ocorre nas propriedades FAMILIAR e JOCKEY. Além disso estas se situam dentro do perímetro urbano, com alta densidade populacional e sem planejamento de infraestrutura referente a esgotamento e captação de água. Desta forma, nossa hipótese é de que possa estar havendo contaminação fossa-poço através do lençol freático e assim, veiculação hídrica desses microrganismos. Importante realçar os estudos de Baldursson e Karanis (2011) onde enfatizaram que a relevância das infecções em animais não está somente limitada ao impacto na saúde ou na produção, mas pode ser considerada como uma referência para a saúde pública, uma vez que estes são considerados como fonte de transmissão, infectando pessoas pelo contato direto ou pela contaminação de fontes de água. Concordamos com esta linha de pensamento, uma vez que corrobora com nossa hipótese de que os equinos participam da cadeia de transmissão de parasitas entéricos, principalmente pelo volume de fezes liberadas no ambiente e excreção perto de fontes de captação de água.

Portanto, informações sobre a ocorrência de patógenos de veiculação hídrica em animais, principalmente, equinos, que embora de grande porte são caracterizados como de companhia ou de lazer, estando os mesmos intimamente relacionados ao homem, podem auxiliar na gestão de tratamento de águas pelos municípios como citado por Bakir et al., (2003). Desta forma, nossos resultados

contribuem de forma significativa como marcadores de qualidade da água utilizada pela população das regiões do estudo.

## **8. CONCLUSÃO**

Levando em consideração os resultados obtidos nas condições em que foram realizados os experimentos desta dissertação, podemos concluir que: Provavelmente os equinos da região de Campos dos Goytacazes – RJ fazem parte da cadeia epidemiológica de patógenos entéricos de possível potencial zoonótico.



## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ALLA, M.D., JACKSON, T.F., GATHIRAM, V., EL-HAWEY, A.M. & RAVDIN, J.I. Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* infections from nonpathogenic infections by detection of galactose-inhibitable adherence protein antigen in sera and faeces. **Journal of Clinical Microbiology** v.31 n.11 p.2845-2850, 1993.

ABD-ALLA, M.D., JACKSON, T.F., REDDY, S. e RAVDIN, J.I. Diagnosis of invasive amoebiasis by enzyme-linked immunosorbent assay of saliva to detect amebic lectin antigen and anti-lectin immunoglobulin G antibodies. **Journal of Clinical Microbiology** v.38 n.6 p.2344-2347, 2000.

ABD-ALLA, M.D., WAHIB, A. e RAVDIN, J.I. Diagnosis of amoebic colitis by antigen capture ELISA in patients presenting with acute diarrhoea in Cairo. **Egyptian Tropical Medicine and International Health** v.7 n.1 p.6, 2002.

ABRAHAMSEN, M.S.; TEMPLETON, T.J.; ENOMOTO, S.; ABRANTE, J.E.; ZHU, G.; LANCTO, C.A.; DENG, M.; LIU, C.; WIDMER, G.; TZIPORI, S.; BUCKQ, G.A.; XU, P.; BANKIER, A.T.; DEAR, P.H.; KONFORTOV, B.A.; SPRIGGS, H.F.; IYER, L.; ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L., KAPUR, V. Complete genome sequence of the Apicomplexan *Cryptosporidium parvum*. **Science** v. 304, n.5669 p. 441-445, 2004.

ACHA, P.N. & SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: clamidiosis, rickettsiosis y virosis**. Editora Publicación Científica y Técnica, 3ª Ed. Washington, 439 p., 2003.

ACUNA-SOTO, R., SAMUELSON, J., DE GIROLAMI, P., ZARATE, L., MILLAN-VELASCO, F., SCHOOLNICK, G. e WIRTH, D. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v. 48 n.1 p. 58-70, 1993.

ADAMS, E.B. e MACLEOD, I.N. Invasive amoebiasis. I. Amoebic dysentery and its complication. **Medicine** v.56 n.4 p.315-323, 1977.

AGUIRRE, A., WARHURST, D.C., GUHL, F. e FRAME, I.A. Polymerase chain reaction solution hybridization enzyme-linked immunoassay (PCR-SHELA) for the differential diagnosis of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v.89 n.2 p.187- 188, 1995.

ALI, I.K., HOSSAIN, M.B., ROY, S., AYEK-KUMI, P.F., PETRI JR., W.A., HAQUE, R. E CLARK, C.G. *Entamoeba moshkovskii* infection in children, Bangladesh. **Emerging of Infectious Disease** v.9 n.5 p.580- 584, 2003.

ALMEIDA, A.A., POZIO, E., CACCIO, S.M., Genotyping of *Giardia duodenalis* cysts by new real-time PCR assays for detection of mixed infections in human samples. **Appl. Environ. Microbiol.** v.76 n.6 p.1895–1901, 2010.

ALONSO, J.L., AMOROS, I., CAÑIGRAL, I., Development and evaluation of a real-time PCR assay for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage samples. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.89 n.4 p.1203–1211, 2011.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25 n.17 p.3389-3402, 1997.

AMAR CFL, DEAR PH, PEDRAZA-DIAZ S, LOOKER N, LINNANE E, MCLAUCHLIN J. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. **J Clin Microbiol**; v.40 n.2 p.446–52, 2002.

AYED, S.B., AOUN, K., MAAMOURI, N., ABDALLAH, R. B. e BOURATBINE, A. Short Report: First molecular identification of *Entamoeba moshkovskii* in human stool samples in Tunisia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v.79 n.5 p.706-707, 2008.

AYEH-KUMI, P.F., ALI, I.M., LOCKHART, L.A., GILCHRIST, C.A., PETRI JR., W.A. e HAQUE, R. *Entamoeba histolytica*: genetic diversity of clinical isolates from Bangladesh as demonstrated by polymorphisms in the serine-rich gene. **Experimental Parasitology** v.99 n.2 p.80-88, 2001.

BAKIR, B., TANYUKSEL, M., SAYLAM, F., SULTAN, T., R. ENGIN, A., ALI KASIM, H. e METIN, H. Investigation of waterborne parasites in drinking water sources of Ankara, Turkey. **The Journal of Microbiology** v.41 n.2 p.148-151, 2003.

BALAMUTH, W. Improved egg yolk medium for cultivation of *Entamoeba histolytica* and other intestinal protozoa. **American Journal of Clinical Pathology** v.16 n.6 p. 380-384, 1946.

BALDURSSON S.; KARANIS P.; Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks – an update 2004-2010. **Water Research** n.20 v.45 p.6603-6614, 2011.

BARWICK, R.S., UZICANIN, A., LAREAU, S.M., MALAKMADZE, N., IMNADZE, P., IOSAZA, M., NINASVILI, N., WILSON, M., BISHOP, H., HIGHTOWER, A., PETRI JR., W.A. e JURANEK, D.D. Outbreak of amoebiasis in Tblisi, Republic of Georgia, 1998. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene** v.67 n.6 p. 623-31, 2002.

BAUMANN, D.; GOTTSTEIN, B. A double-antibody sandwich ELISA for the detection of *Entamoeba histolytica* antigen in stool samples of humans. **Tropical Medicine and Parasitology**, v.38, n.2, p.81-85, 1987.

BECK, C; ARAÚJO DE, F.A.P.; OLIQUESKI, A.T.; BREYER, A.S. Frequência da infecção por *Giardia lamblia* (Kunstler, 1882) em cães (*Canis familiaris*) avaliada pelo Método de Faust e cols. (1939) e pela Coloração da Auramina, no município de Canoas, RS, Brasil. **Ciência Rural** v.35 n.1 p.126-130, 2005.

BECK, D.L., DOGAN, N., MARO, V., SAM, N.E., SHAO, J. e HOUP, E.R. High prevalence of *Entamoeba moshkovskii* in a Tanzanian HIV population. **Acta Tropica** v.107 n.1 p.48-49, 2008.

BHATTACHARYA, S., BHATTACHARYA, A., DIAMOND, L.S. e SOLDI, A.T. Circular DNA of *Entamoeba histolytica* encodes ribosomal RNA. **Journal of Protozoology** v.36 n.5 p.455-458, 1989.

BLANC, D. e SARGEANT, P.G. *Entamoeba histolytica* zymodemes: exhibition of gamma and delta bands only of glucose phosphate isomerase and phosphoglucomutase may be influenced by starch content in the medium. **Experimental Parasitology** v.72 n. 1 p.87-90, 1991.

BLESSMANN, J., BUSS, H., UN, P.A., DINH, B.T., NGO, Q.T., VAN, A.L., ALLA, M.D., JACKSON, T.F., RAVDIN, J.I. e TANNICH, E. Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faecal samples. **Journal of Clinical Microbiology** v.40 n.12 p.4413-4417, 2002a.

BLESSMANN, J., VAN LINH, P., NU, P.A., THI, H.D., MULLER-MYHSOK, B., BUSS, H. e TANNICH, E. Epidemiology of amoebiasis in a region of high incidence of amoebic liver abscess in central Vietnam. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene** v.66 n.5 p.578-83, 2002b.

BLESSMANN, J., ALI, I.K., UN, P.A., DINH, B.T., VIET, T.Q., VAN, A.L., CLARK, C.G. e TANNICH, E. Longitudinal study of intestinal *Entamoeba histolytica* infections in asymptomatic adult carriers. **Journal of Clinical Microbiology** v.41 n.10 p.4745-4750, 2003.

BRITTEN, D., WILSON, S.M., MCNERNEY, R., MOODY, A.H., CHIODINI, P.L. e ACKERS, J.P. An improved colorimetric PCR-based method for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. **Journal of Clinical Microbiology** v.35 n.5 p.3044-3045, 1997.

BRODY, J.R.; KERN, S.E. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v.333, n.1, p.1-13, 2004.

CALDERARO, A., GORRINI, C., BOMMEZZADRI, S., PICCOLO, G., DETTORI, G. e CHEZZI, C. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: comparison of two PCR assays for diagnosis in a non-endemic setting. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v.100 n.5 p.450-457, 2006.

CAMA V.A.; ARROWOOD M. J.; ORTEGA Y. R.; XIAO L.. Molecular characterization of the *Cryptosporidium parvum* IOWA isolate kept in different laboratories. **J Eukaryot Microbiol** v.53 Suppl 1:S40-2, 2006.

CAREY C. M.; LEE H.; TREVORS J. T.. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research** v.38 n.4 p.818-862, 2004.

CARVALHO-ALMEIDA, T.T. **Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp (Apicomplexa: Cryptosporiidae) em amostras fecais: extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase)**. Tese de Doutorado-Faculdade de Saúde Pública da USP, 143p., 2004.

CDC-Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, EUA. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/>>. Acesso em: 15 de março de 2015.

CHACÍN-BONILLA, L. *Cryptosporidium*: phylogeny and taxonomy. **Investigación Clínica**, v.48, n.1, p.1-4, 2007.

CHALMERS, R.M., THOMAS, A.L., BUTLER, B.A., MOREL, M.C. Identification of *Cryptosporidium parvum* genotype 2 in domestic horses. **Vet Rec**. v.156 n.2 p.49-50, 2005.

CHALMERS, R.M.; DAVIES, A.P. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. **Experimental Parasitology**, v.124 n.1 p.138-146, 2010.

CHÁVEZ, B.; GONZALEZ-MARISCAL, L.; CEDILLO-RIVERA, R.; MARTÍNEZPALOMO, A.. Giardia lamblia: in vitro cytopathic effect of human isolates. **Experimental Parasitology**, v.80 n.1, p.133-138, 1995.

CLARK, C.G. e DIAMOND, L.S. Ribosomal RNA genes of 'pathogenic' and 'nonpathogenic' *Entamoeba histolytica* are distinct. **Molecular Biochemistry and Parasitology** v.49 n.2 p.297-302, 1991.

CLARK, C.G. e DIAMOND, L.S. Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* from other intestinal protozoa by riboprinting. **Archives of Medical Research** v.23 n. 2 p.15-16, 1992.

CLARK, C.G e DIAMOND, L.S. *Entamoeba histolytica*: a method for isolate identification. **Experimental Parasitology** v.77 n.4 p.450-455, 1993.

CLARK, C.G. Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* Brumpt 1925, *Entamoeba insolita* Geiman and Wichterman 1937 and *Entamoeba ranarum* Grassi 1879. **Journal of Eukaryotic Microbiology** v.42 n.5 p.590-593, 1995.

CLARK, C.G. e DIAMOND, L.S. Intraspecific variation and phylogenetic relationships in the genus *Entamoeba* as revealed by riboprinting. **Journal of Eukaryotic Microbiology** v.44 n.2 p.142-154, 1997.

CLARK, C.G. e DIAMOND, L.S. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. **Clinical Microbiology Reviews** v.15 n.3 p.329-341, 2002.

CORRÊA, S.H.R.; PASSOS, E.C. Wild animals and public health. In: MURRAY E. FOWLER, D.V.M.; **Biology, medicine, and surgery of South American wild animals**. Ames: Iowa University Press, p. 493-499, 2001.

DE LA VEGA, H., SPECHT, C.A., SEMINO, C.E., ROBBINS, P.W., EICHINGER, D., CAPLIVSKI, D., GHOSH, S. e SAMUELSON, J. Cloning and expression of chitinases of *Entamoeba*. **Molecular and Biochemical Parasitology** v.85 n.2 p.139-147, 1997.

DEL COCO V. F., CORDOBA M. A. BASUALDO J.A.; Cryptosporidiosis: una zoonosis emergente. **Revista Argentina de Microbiologia** v.41 n.3 p.185-196, 2009.

DE PAUW, K.. Therapeutic horseback riding in Europe and America. In: ANDERSON R.K. **The Pet Connection: Its Influence on Our Health and Daily Life**. Hart LA ed. Minneapolis: Center to Study Human-Animal Relationships and Environments, p.141-153, 1984.

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

DIAMOND, L.S. Improved method for the monoxenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amoebae with trypanosomatids. **Journal of Parasitology** v.54 n.4 p.715-719, 1968.

DIAMOND, L.S. e BARTGIS, I.L. *Entamoeba moshkovskii*: axenic cultivation. **Experimental Parasitology** v.28 n.2 p.171-175, 1970.

DIAMOND, L.S., HARLOW, D.R. e CUNNICK, C.C. A new médium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v.72 n.4 p.431-432, 1978.

DIAMOND, L.S. A new liquid medium for xenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other lumen dwelling protozoa. **Journal of Parasitology** v.68 n.5 p.958-959, 1982.

DIAMOND, L.S., CLARK, C.G. e CUNNICK, C.C. YI-S, a casein free medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*, related *Entamoeba*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Eukaryotic Microbiology** v.42 n.3 p.277-278, 1995.

ECKMANN, L., REED, S.L., SMITH, J.R. e KAGNOFF M.F. *Entamoeba histolytica* trophozoites induces an inflammatory cytokines response by culured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleuken-1 alpha. **Journal of Clinical Investigation** v.96 n.3 p.1269-1279, 1995.

ESPINOSA-CANTELLANO, M. e MARTINEZ-PALOMA, A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. **Clinical Microbiology Reviews** v.13 n.2 p.318- 331, 2000.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária**, São Paulo, Manole Ltda, 4 ed, v. 1, p. 556-557, 1997.

FAYER, R; UNGAR, B. L. P. Cryptosporidium spp. and cryptosporidiosis, **Microbiological Reviews**. v.50 n.4 p.458-483, 1986.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology** v.30 n.12-13 p.1305-1322, 2000.

FAYER, R. General biology. In: FAYER, R.; XIAO, L. **Cryptosporidium and cryptosporidiosis**. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, cap.1, p.1-42, 2007.

FARACO, C.B.; SEMINOTTI, N. A relação homem-animal e a prática veterinária. **Revista CFMV**. v.32 n.2 p.57-62, 2004.

FENG, Y., XIAO, L., Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. **Clin. Microbiol. Rev.** v.24 n.1 p.110–140, 2011.

FERNANDES. M.C., RIBEIRO M.G.; Enteropatógenos de potencial zoonótico como indicadores de contaminação do solo/areia de parques e praças de recreação humana. **Vet. e Zootec.** v.17 n.4 p.469-479, 2010.

FERRARO, C.C.; KLOSS, A.B.; SOUZA, D.F. DE; DECONTO, I.; BIONDO, A.W.; MOLENTO, M.B. Parasitological prevalence of cart-horses in Curitiba, Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** v.17 supl.1 p.175-177, 2008.

FIUZA, V.R.S.; CONSENDEY, R.I.J.; OLIVEIRA, F.C.R. DE Swine cryptosporidiosis related to production systems in the state of Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** v.17 supl.1 p.224-229, 2008.

FIUZA, V.R.S. ; CONSENDEY R. I. J., TEIXEIRA E. F.; SANTÍN M.; FAYER R.; OLIVEIRA F. C. R.; Molecular characterization of *cryptosporidium* in Brazilian sheep. **Veterinary Parasitology** v.175 n.3-4 p.360-362, 2011.

FOTEDAR, R; STARK, D.; BEEBE, N.; MARRIOTT, D.; ELLIS, J.; HARKNESS, J. PCR detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in stool samples from Sydney, Australia. **Journal of Clinical Microbiology** v.45 n.3 p.1035-1037, 2007.

FREEDMAN, L., MADDISON, S.E. e ELSDON-DEW, R. Monoxenic culture of *Entamoeba histolytica* derived from human liver abscesses. **South Africa Journal of Medical Science** v.23 n.1 p.9-12, 1958.

FREITAS, M.A., VIANNA, E.N., MARTINS, A.S., SILVA, E.F., PESQUERO, J.L. e GOMES, M.A. A single step duplex PCR to distinguish *Entamoeba histolytica* from *Entamoeba dispar*. **Parasitology** v.128 n.6 p.625-628, 2004.

FRIEDMANN, E. The value of pets for health and recovery in: Waltham Symposium 20, 1990, Proceedings... Pets, benefits and practice. 1st European Congress of the British Small Animal Veterinary Association, Cheltenham, England: **BVA Publications** p.8-17, 1990.

GARCIA, L.S., BRUCKNER, D.A., BREWER, T.C. e SHIMIZU, R.Y. Comparison of indirect fluorescent-antibody amoebic serology with counter immunoelectrophoresis

and indirect hemagglutination amoebic serologies. **Journal of Clinical Microbiology** v.15 n.4 p.603-605, 1982.

GARCIA, L.S. e BRUCKNER, D.A. **Diagnostic Medical Parasitology**, Washington, Ed. American Society for Microbiology 937 p.,1997.

GARCIA, L.S., SHIMIZU, R.Y. e BERNARD, C.N. Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human faecal specimens using the Triage parasite panel enzyme immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology** v.38 n.9 p.3337-3340, 2000.

GARCIA-ZAPATA MTA; CUBA CC; SILVA AE; LEITE SA; REIS MI; MOREIRA AF; MALTAROLLO TAP; GOMES R; FONSECA RA. Infecções por Parasitas Oportunistas em Pacientes HIV/SIDA Positivos, no Hospital Universitário de Brasília. **Rev BSBM** v.37 n.1-2 p.14-18, 2000.

GATHIRAM, V. e JACKSON, T.F.H.G. Frequency distribution of *Entamoeba histolytica* zymodemes in a rural South African population. **The Lancet** v.30 n.8431 p.719- 721, 1985.

GATHIRAM, V. e JACKSON, T.F.H.G. A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. **South African Medical Journal** v.72 n.10 p.669-672, 1987.

GATTI, S., SWIERCZYNSKI, G., ROBINSON, F., ANSEMI, M., CORRALES, J., MOREIRA, J., MONTALVO, G., BRUNO, A., MASERATI, R., BISOFFI, Z. e SCAGLIA, M. Amebic infections due to *Entamoeba histolytica*- *E. dispar* complex: a study of the incidence in a remote rural area of Ecuador. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v.67 n.1 p.123-127, 2002.

GENNARI, S.M.; SOUZA, S. **Giardiase**. São Paulo: Fort Dodge Saúde Animal LTDA. Boletim Técnico, [s.n.] 13p, 2002.

GEURDEN, T., GELDHOF, P., LEVECKE, B., MARTENS, C., BERKVEN, D., CASAERT, S., VERCRUYSSSE, J., CLAEREBOUT, E., Mixed *Giardia duodenalis* assemblage A and E infections in calves. **Int. J. Parasitol.** v.38 n.2 p.259–264, 2007.

GOMES, A.D., BARRETA, C., ZIEGLER, D.P., SAUSEN, L., STOEVEER, N., SANGIONI, L.A., VOGEL, F.S.F., MONTEIRO, S.G., ZANELLA, A. Prevalência de *Cryptosporidium* spp e *Giardia* sp em equinos estabulados no Jockey Club de Santa Maria – RS, Brasil. **Ciência Rural** v.38 n.9 p.2662-2665, 2008.

GONZALEZ-RUIZ, A., HAQUE, R., AGUIRE, A., CASTANON, G., HALL, A., GUHL, F., RUIZ- PALACIOS, G., MILES, M.A. e WARHURST, D.C. Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. **Journal of Clinical Pathology** v.47 n.3 p.236- 239, 1994.

GONZALEZ, C.R., ISIBASI, A., ORTIZ-NAVARRETE, V., PANIAGUA, J., GARCIA, J.A., RAMIREZ, A., SALVATIERRA, B., TAPIA, R., SEPULVEDA, J., GUTIERREZ,

G. e KUMATE, J. Prevalence of antibodies against *Entamoeba histolytica* in Mexico measured by ELISA. **Epidemiology and Infection** v.115 n.3 p.535-543, 1995.

GRINBERG, A., LEARMONTH, J., KWAN, E., POMROY, W., VILLALOBOS, N.L., GIBSON, I., WIDMER, G. Genetic Diversity and Zoonotic Potential of *Cryptosporidium parvum* Causing Foal Diarrhea. **J. Clin. Microbiol.** v.46 n.7 p.2396-2398, 2008.

GUERRANT, R.L. The global problems of amoebiasis: current status, research needs, and opportunities for progress. In: **Parasitic Diseases**, Ed. Springer-Verlag, 2ª Ed. v.8 p.218-227, 1986.

GUTIÉRREZ-CISNEROS M.J.; MARTÍNEZ-RUIZ R.; SUBIRATS M.; MERINO F.J.; MILLÁN R. e FUENTES I., Evaluación de dos métodos inmunocromatográficos comerciales para el diagnóstico rápido de *Giardia duodenalis* y *Cryptosporidium* spp. en muestras de heces. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.** v.29 n.3 p.201-203, 2011.

HAMZAH, Z., PETMITR, S., MUNGTHIN, M., LEEYAYOOVA, S. e CHAVALITSEWINKOON- PETMITR, P. Development of multiplex real-time polymerase chain reaction for detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in clinical specimen. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v.83 n.4 p.909-913, 2010.

HAQUE, R., KRESS, K., WOOD, S., JACKSON, T.F.G.H., LYERLY, D., WILKINS, T. e PETRI JR., W.A. Diagnosis of pathogenic *Entamoeba histolytica* infection using a stool ELISA based on monoclonal antibodies to the galactose specific adhesin. **Journal of Infectious Diseases** v.167 n.1 p.247-249, 1993.

HAQUE, R., NEVILLE, L.M., HAHN, P. e PETRI JR., W.A. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. **Journal of Clinical Microbiology** v.33 n.10 p.2558-2561, 1995.

HAQUE, R.; FARUQUE, A.S.; HAHN, P.; LYERLY, D.M.; PETRI JR, W.A. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. **Journal of Infectious Diseases** v.175 n.3 p.734-736, 1997.

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

HAQUE, R., ALI, I.K.M., SACK, R.B., FARR, B.M., RAMAKRISHNAN, G. e PETRI JR., W.A. Amoebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children. **Journal of Infectious Disease** v.183 n.12 p.1787-1793, 2001.

HAQUE, R., DUGGAL, P., ALI, I.M., HOSSAIN, M.B., MONDAL, D., SACK, R.B., FARR, B.M., BEATY, T.H. e PETRI JR., W.A. Innate and acquired resistance to amoebiasis in Bangladeshi children. **Journal of Infectious Disease** v.186 n.4 p.547-552, 2002.



HAQUE, R., HUSTON, C.D., HUGHES, M., HOUP, E. e PETRI JR., W.A. Current concepts: Amoebiasis. **New England Journal of Medicine** v.348 n.3 p.1565-1573, 2003.

HAQUE R.; MONDAL D.; DUGGAL P.. *Entamoeba histolytica*. Infection in children and protection from subsequent amebiasis. **Infect. Immun.** v.74 n.2 p.904-9, 2006.

HECKENDORN, F.; GORAN, E.K.N.; FELGER, I.; VOUNATSOU, P.; YAPI, A.; OETTLI, A., MARTI, H.P.; DOBLER, M.; TRAORÉ, M.; LOHOURIGNON, K.L.; LENGELER, C. Species-specific field-testing of *Entamoeba* spp in an area of high endemicity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.96 n.5 p.521-528, 2002.

HIGGINS, J.Á.; JENKINS, M.C.; SHELTON, D.R.; FAYER, R.; KARNS, J.S. Rapid extraction of DNA from *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* for use in PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67 n.11 p.5321-5324, 2001.

HIRA, P.R., IQBAL, J., AL-ALI, F., PHILIP, R., GROVER, S., D'ALMEIDA, E. e AL-ENEIZI, A.A. Invasive amoebiasis: challenges in diagnosis in a non-endemic country (Kuwait). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v.65 n.4 p.341-345, 2001.

HOPKINS, R. M., B. P. MELONI, D. M. GROTH, J. D. WETHERALL, J. A. REYNOLDSON, AND R. C. THOMPSON.. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. **J. Parasitol.** v.83n.1 p.44–51, 1997.

HUGHES, M.A. e PETRI JR., W.A. Amoebic liver abscess. **Infectious Disease Clinics of North America** v.14 n.2 p.565-582, 2000.

HUNG, C.C., CHEN, P.J., HSIEH, S.M., WONG, J.M., FANG, C.T., CHANG, S.C. & CHEN, M.Y. Invasive amoebiasis: an emerging parasitic disease in patients infected with HIV in an area endemic for amoebic infection. **AIDS** v.13 n.17 p.2421-2428, 1999.

HUNG, C.C., DENG, H.Y., HSIAO, W.H., HSIEH, S.M., HSIAO, C.F. e CHEN, M.Y. Invasive amebiasis as an emerging parasitic disease in patients with human immunodeficiency virus type 1 infection in Taiwan. **Archive of Internal Medicine** v.165 n.4 p.409-419, 2005.

HUSTON, C.D., HAQUE, R. e PETRI JR., W.A. Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. **Expert Reviews in Molecular Medicine** v.1 n.22 p.1- 11, 1999.

IRWIN, P., Companion animal parasitology: a clinical perspective, **International Journal for Parasitology** v.32 n.5 p.581 – 593, 2002.

JACKSON, T.F., ANDERSON, C.B. e SIMJEE, A.E. Serological differentiation between past and present infections in hepatic amoebiasis. **Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v.78 n.3 p.342-345, 1984.

JACKSON, T.F., GATHIRAM, V. e SIMJEE, A.E. Seroepidemiological study of antibody responses to the zymodemes of *Entamoeba histolytica*. **The Lancet** v.1 n.8431 p.716-719, 1985.

JACKSON, T.F. e SUPARSAD, S. Zymodeme stability of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. **Archives of Medical Research** v.28 n.1 p.304-305, 1997.

JEX A.R.; GASSER R.B.; Analysis of the genetic diversity within *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* from imported and autochthonous cases of human cryptosporidiosis by mutation scanning. **Electrophoresis**. v.29 n.20 p.4119-29, 2008.

JOHNSON, E., ATWILL, E. R., FILKINS, M. E., KALUSH J. The prevalence of shedding of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. based on a single fecal sample collection from each of 91 horses used for backcountry recreation. **J Vet Diagn Invest**. v.9 n.1 p.56-60, 1997.

JOKIPII, A.M.; JOKIPII, L. Prepatency of giardiasis. **Lancet**, v.1 n.8021 p.1095-1097, 1977.

JONES, W.R. The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*; with a method for evaluating the anti-amoebic properties of new compounds. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** v.40 n.1 p.130-140, 1946.

JULIANO, R. S.; JAYME, V. de S.; FIORAVANTI, M. C. S.; PAULO, N. M.; ATAYDE, I. B. **Terapia assistida por animais (TAA): uma prática multidisciplinar para o benefício da saúde humana.** Goiânia. Disponível em: [www.vet.ufg.br/bioetica/arquivosPDF/Terapiaassistidaporanimais.pdf](http://www.vet.ufg.br/bioetica/arquivosPDF/Terapiaassistidaporanimais.pdf). 2006. Acesso em: 08 Agosto 2015.

KATZENSTEIN, D., RICKERSON, V. e BRAUDE, A. New concepts of amebic liver abscess derived from hepatic imaging, serodiagnosis and hepatic enzymes in 67 consecutive cases in San Diego. **Medicine (Baltimore)** v.61 n.4 p.237-246, 1982.

KEBEDE, A., VERWEIJ, J.J., ENDESHAW, T., MESSELE, T., TASEW, G., PETROS, B. e POLDERMAN, A.M. The use of realtimePCR to identify *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* infections in prisoners and primary-school children in Ethiopia. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** v.98 n.1 p.43-48, 2004.

KOBAYASHI, S., IMAI, E., TACHIBANA, H., FUJIWARA, T. e TAKEUCHI, T. *Entamoeba dispar*: cultivation with sterilized *Crithidia fasciculata*. **Journal of Eukaryotic Microbiology** v.45 n.2 p.3S-8S, 1998.

KOSTOPOULOU D.; CASAERT S.; TZANIDAKIS N.; VAN DOORN D.; DEMELER J.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA G.; SARATSIS A.; VOUTZOURAKIS N.; EHSAN A.; DOORNAERT T.; LOOIJEN M.; DE WILDE N.; SOTIRAKI S.; CLAEREBOUT E.; GEURDEN T.. The occurrence and genetic characterization of

*Cryptosporidium* and *Giardia* species in foals Belgium, The Netherlands, Germany and Greece. **Vet. Parasitology** v.211 n.3-4 p.0304-4017, 2015.

KROGSTAD, D.J., SPENCER JR., H.C., HEALY, G.R., GLEASON, N.N., SEXTON, D.J. e HERRON, C.A. Amoebiasis: epidemiologic studies in the United States, 1971-1974. **Annals of Internal Medicine** v.88 n.1 p.89-97, 1978.

KUNSTLER J. Sur cinq protozoaires parasites nouveaux. **C R Seances. Soc Biol Fil.** v.95 n.1 p.347-9, 1882.

LALLA, F.D., RINALDI, E., SANTORO, D., NICOLIN, R. e TRAMARIN, A. Outbreak of *E. histolytica* & *G. lamblia* infections in travellers returning from the tropics. **Infection** v.20 n.2 p.78-82, 1992.

LAXER, M. A.; ALCANTARA, A. K.; JAVATO-LAXER, M.; MENORCA, D. M.; FERNANDO, M. T.; RANOA, C. P. Immune response to cryptosporidiosis in Philippine children. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v.42 n.2 p.131-139, 1990.

LEBER, A.L.; NOVAK-WEEKLEY, S.; MURRAY P. R.; BARON E. J.; JORGENSEN J. H.; LANDRY M.L.; e PFALLER M. A.. Intestinal and urogenital amoeba, flagellates, and ciliates. **Manual of Clinical Microbiology.** v.2 n. Ed. 9, p.2092-2112, 2006.

LEIB, M.S.; ZAJAC, A.M. Giardiasis infection in dogs and cats. **Veterinary Medicine** v.94 n.1 p.793-802, 1999.

LEIVA, B., LEBBAD, M., WINIECKA-KRUSNELL, J., ALTAMIRANO, I., TELLEZ, A. e LINDER, E. Overdiagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Nicaragua: a microscopic, Triage parasite panel and PCR study. **Archives of Medical Research** v.37 n.4 p.529-534, 2006.

LI, E. e STANLEY JR, S.L. Protozoa: Amoebiasis. **Gastroenterology Clinics of North America** v.25 n.1 p.471-492, 1996.

LIANG, S.Y., CHAN, Y.H., HSIA, K.T., LEE, J.L., KUO, M.C., HWA, K.Y., CHAN, C.W., CHIANG, T.Y., CHEN, J.S., WU, F.T. e JI, D.D. Development of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Entamoeba histolytica*. **Clinical Microbiology** v.47 n.6 p.1892-1895, 2009.

LITH L. V.; SOBA B.; VIZCAINO V. V.; SVARD S.; SPRONG H.; TOSINI F.; POZIO E.; CACCIO M. S.. A real-time assemblage-specific PCR assay for the detection of *Giardia duodenalis* assemblages A, B and E in fecal samples. **Veterinary Parasitology** v.211 n.1-2 p.28-34, 2015.

LUDWIG, R.; MARQUES, S.M.T. Primeiro relato de *Cryptosporidium spp.* em emas (*Rhea americana*) cativas de zoológico no Brasil. **Parasitologia Latinoamericana**, v.63 n.1-2-3-4 p.76 - 80, 2008.

MAGANA-GARCÍA, M. e ARISTA-VIVEROS, A. Cutaneous amoebiasis in children. **Pediatric Dermatology** v.10 n.4 p.352- 355, 1993.

MAJEWSKA A. C.; SOLARCZYK P.; TAMANG L.; GRACZYK T.K., Equine *Cryptosporidium parvum* infections in Western Poland. **Parasitol. Res.** v.93 n.4 p.274-278, 2004.

MARTINEZ-PALOMO, A.I., GONZALEZ-ROBLES, B., CHAVEZ, E., OROZCO, S., FERNANDEZ- CASTELO, S. e CERVANTES, A. Structural bases of the cytolytic mechanism of *Entamoeba histolytica*. **Journal of Parasitology** v.32 n.1 p.166-175, 1985.

McGLADE, T.R.; ROBERTSON, I.D.; ELLIOT, A.D.; READ, C.; THOMPSON, R.C.A. Gastrointestinal parasites of domestic cats in Perth, Western Australia. **Veterinary Parasitology** v. 117 n.4 p.251-262, 2003.

MCLAUCHLIN, J., C. AMAR, S. PEDRAZA-DIAZ, AND G. L. NICHOLS. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. **J. Clin. Microbiol.** v.38 n.11 p.3984–3990, 2000.

MERINO, E.; GLENDER, W.; DEL MURO, R.; ORTIZ-ORTIZ, L. Evaluation of the ELISA test for detection of *Entamoeba histolytica* in feces. **Journal of Clinical Laboratory Analysis** v.4 n.1 p.39-42, 1990.

MHLANGA, B.R., LANOIE, L.O., NORRIS, H.J., LACK, E.E. e CONNOR, D.H. Amoebiasis complicating carcinomas - a diagnostic dilemma. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v.46 n.6 p.759-764, 1992.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso/Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica** Brasília: Ministério da Saúde 8<sup>a</sup> Ed. 444 p, 2010.

MIRELMAN, D., NUCHAMOWITZ, Y.; e STOLARSKY, T. Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. **Journal of Clinical Microbiology** v.35 n.9 p.2405-2407, 1997.

MONIS, P.T.; ANDREWS, R.H.; SAINT, C.P. Molecular biology techniques in parasite ecology. **International Journal for Parasitology** v.32 n.5 p.551-562, 2002.

MORAN, P.; RAMOS, F.; RAMIRO, M.; CURIEL, O.; GONZÁLEZ, E.; GÓMEZ, A., GARCÍA, G.; MELENDRO, E.I.; XIMÉNEZ, C. *Entamoeba histolytica* and/or *Entamoeba dispar*: infection frequency in HIV/AIDS patients in Mexico City. **Experimental Parasitology** v.110 n.3 p.331-334, 2005.

MORGAN, U.M.; XIAO, L.; LIMOR, J.; GELIS, S.; RAIDAL, S.R.; FAYER, R.; LAL, A.A.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R.C. *Cryptosporidium meleagridis* in an Indian ringneck parrot (*Psittacula krameri*). **Australian Veterinary Journal** v.78 n.3 p.182-183, 2000.

MORI, Y., NAGAMINE, K., TOMITA, N. e NOTOMI, T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v.289 n.1 p.150-154, 2001.

MOTTA, M.E.F.A.; da SILVA, G.A.P. Diarréia por parasitas. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil** v.2 n.2 p.117-127, 2002.

MMWR. Cryptosporidiosis: an assessment of chemotherapy of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Morbidity and Mortality Weekly Report** v.31 n.44 p.589-592, 1982.

MUNDIM, M.J.S.; SOUZA, S.Z.; HORTÊNCIO, S.M.; CURY, M.C. Freqüência de *Giardia* spp. por duas técnicas de diagnóstico em fezes de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte v.55 n.6 p.770-773, 2003.

NAGAMINE, K., HASE, T. e NOTOMI, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. **Molecular and Cellular Probes** v.16 n.3 p.223-229, 2002.

NAZEMALHOSSEINI MOJARAD, E., NOCHI, Z., SAHEBEKHTIARI, N., ROSTAMI NEJAD, M., DABIRRI, H., REZA ZALI, M., KAZEMI, B. e HAGHIGHI, A. Discrimination of *Entamoeba moshkovskii* in patients with gastrointestinal disorders by singlerounded PCR. **Japanese Journal of Infectious Disease** v.63 n.2 p.136-138, 2010.

NIICHIRO, A., NISHIKAWA, Y., YASUKAWA, A. e HARUKI, K. *Entamoeba histolytica* outbreaks in institutions for the mentally retarded. **Japan Journal of Infectious Diseases** v.52 n.3 p.135-136, 1999.

NOTOMI, T., OKAYAMA, H., MASUBUCHI, H., YONEKAWA, T., WATANABE, K., AMINO, N. e HASE, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research** v.28 n.12 p.E63, 2000.

NÚÑEZ, F.A.; GINORIO, D.E.; FINLAY, C.M. Control de la calidad Del diagnóstico coproparasitológico en la provincia de Ciudad de La Habana, Cuba. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro v.13 n.1, 1997.

NUNES, C.M.; PENA, F.C.; NEGRELLI, G.B.; ANJO, C.G.S.; NAKANO, M.M.; STOBBE, N.S. Ocorrência de larva migrans na areia de áreas de lazer das escolas municipais de ensino infantil, Araçatuba, SP, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v.34 n.6 p.656-658, 2000.

NÚÑEZ Y.O., FERNÁNDEZ M.A., TORRES-NUÑEZ D.,. Multiplex polymerase chain reaction amplification and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* DNA from stool samples. **Am J Trop Med Hyg** v.64 n.5-6 p.293-7, 2001.

O'DONOGHUE, P. J. Cryptosporidium and cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal for Parasitology** v.25 n.2 p.139-195, 1995.

OHNISHI, K., KATO, Y., IMAMURA, A., FUKAYAMA, M., TSUUNNODA, T. e SAKAUE, Y. Present characteristics of symptomatic *Entamoeba histolytica* infection in the big cities of Japan. **Epidemiology of Infection** v.132 n.1 p.57-60, 2004.

OLIVA, A.; HERION, P.; CAPIN, R.; ORTIZ-ORTIZ, L.; DEL MURO, R. Diagnosis of *Entamoeba histolytica* in feces by ELISA. **Journal of Clinical Laboratory Analysis** v.1 n.2 p.322-325, 1987.

ONG, S.J., CHENG, M.Y., LIU, K.H. e HORNG, C.B. Use of the ProSpecT microplate enzyme immunoassay for the detection of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica* in faecal specimens. **Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v.90 n.3 p.248-249, 1996.

OVERALL, K. L.. Clinical behavioral medicine for small animals. **Mosby-Year Book, Inc.**,1997.

PARIJA, S.C. e KHAIRNAR, K. *Entamoeba moshkovskii* and *Entamoeba dispar*-associated infections in Pondicherry, India. **Journal of Health Polpulation and Nutrition** v.23 n.3 p.292-295, 2005.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Epidemiology Bulletin** v.18n.1 p.13-14, 1997.

PARK, W.B., CHOE, P.G., JO, J.H., KIM, S.H., BANG, J.H. e KIM, H.B. Amebic liver abscess in HIV-infected patients, Republic of Korea. **Emergency of Infectious Disease** v.13 n.3 p.516-517, 2007.

PATTERSON, M. e SCHOPPE, L.E. The presentation of amoebiasis. **Medical Clinics of North America** v.66 n.3 p.689-705, 1982.

PERUCA, L.C.B.; LANGONI, H.; LUCHEIS, S.B. Larva migrans visceral e cutânea como zoonoses: revisão de literatura. **Veterinária e Zootecnia** v.16 n.4 p.601-616, 2012.

PETRI W.A. e SINGH, U. Diagnosis and management of amoebiasis. **Clinical Infectious Disease** v.29 n.5 p.1117-1125, 1999.

PETRI W.A., HAQUE, R. e MANN, B.J. The bittersweet interface of parasite and host: Lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. **Annual Review of Microbiology** v.56 n.1 p.39-64, 2002.

PICKERIING, L.K.; WOODWARD, W.E.; DUPONT, H.L.; SULLIVAAN, P. Occurrence of *Giardia lamblia* in children in daycare centers. **Journal of Pediatrics** v.104 n.4 p 522-526, 1984.

PILLAI, D.R., KEYSTONE, J.S., SHEPPARD, D.C., MACLEAN, J.D., MACPHERSON, D.W. e KAIN, K.C. *Entamoeba histolytica* & *Entamoeba dispar*: epidemiology and comparison of diagnostic methods in a setting of non endemicity. **Clinical Infectious Diseases** v.29 n.1 p.1315-1318, 1999.

PINHEIRO, S.M.B., CARNEIRO, R.M., ACA, I.S., IRMAO, J.I., MORAIS, M.A., COIMBRA, M.R.M. e CARVALHO, L.B. Determination of the prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in the Pernambuco State of Northeastern Brazil by a polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v.70 n.2 p.221-224, 2004.

PLUTZER, J.; KARANIS, P. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: in update. **Veterinary Parasitology** v.165 n.1-2 p.187-192, 2009.

POWLEDGE T.M. The polymerase chain reaction. **Advances in Physiology Education** v.28 p.44-50, 2004.

PROCTOR, E.M. Laboratory diagnosis of amoebiasis. **Clinical Laboratory Medicine** v.16 n.4 p.829-859, 1991.

QUÍLEZ, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; DEL CACHO, E.; CLAVEL, A.; CAUSAPÉ, A.C. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragón (northeastern Spain). **Veterinary Parasitology** v.66 n.3-4 p.139–146, 1996.

QVARNSTROM, Y., JAMES, C., XAYAVONG, M., HOLLOWAY, B.P., VISVESVARA, G.S., SRIRAM, R. e DA SILVA, A.J. Comparison of real-time PCR protocols for differential laboratory diagnosis of amoebiasis. **Journal of Clinical Microbiology** v.43 n.11 p.5491-5497, 2005.

RADOSTITS, O. M., GAY, C. C., BLOOD, D. C., HINCHCLIFF, K. W. Doenças Causadas pelos protozoários. In: **Clínica Veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 9ª ed. Cap.25 p.1176-1180, 2000.

RAMOS, F., MORAN, P., GONZALEZ, E., GARCIA, G., RAMIRO, M., GOMEZ, A., DE LEON MDEL, C., MELENDRO, E.I., VALADEZ, A. e XIMENEZ, C. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: prevalence infection in a rural Mexican community. **Experimental Parasitology** v.110 n.3 p.327- 330, 2005.

RAMOS, F., VALDEZ, E., MORAN, P., GONZALEZ, E., PADILLA, G., GOMEZ, A., RAMIRO, M., MELENDRO, E.I., MUNOZ, O., CLARK, C.G. e XIMENEZ, C. Prevalence of *Entamoeba histolytica* & *Entamoeba dispar* in a highly endemic rural population. **Archives of Medical Research** v.31 n.4Suppl. p.34-35, 2000.

RAVDIN, J.L., JACKSON, T.F., PETRI JR., W.A., MURPHY, C.F., UNGAR, B.L., GATHIRAM, V., SKILOGIANNIS, J. e SIMJEE, A.E. Association of serum antibodies to adherence lectin with invasive amoebiasis and asymptomatic infection with pathogenic *Entamoeba histolytica*. **Journal of Infectious Disease** v.162 n.3 p.768-772, 1990.

READ, C., WALTERS, J., ROBERTSON, I.D., THOMPSON, R.C.A.,. Correlation between genotype *Giardia duodenalis* and diarrhoea. **Int. J. Parasitol.** v.32 n.2 p.229–231, 2002.

RENDTORFF, R.C. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. **American Journal of Hygiene** v.59 n.2 p.209-220, 1954.

RIVERA, W.L., SANTOS, S.R. e KANBARA, H. Prevalence and genetic diversity of *Entamoeba histolytica* in an institution for the mentally retarded in the Philippines. **Parasitology Research** v.98 n.2 p.106-110, 2006.

RIVERA, M.; PARTE DE LA, M.A.; HURTADO, P.; MAGALDI, L.; COLLAZO, M. Giardiasis intestinal. **Mini-Revisión, Investigación Clínica** v.43 n.2 p.119-128, 2002.

RIVERA, W.L., TACHIBANA, H. e KANBARA, H. Field study on the distribution of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in the northern Philippines as detected by the polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v.59 n.6 p.916-921, 1998.

RIVERA, W.L., TACHIBANA, H., SILVA-TAHAT, M.R., UEMURA, H. e KANBARA, H. Differentiation of *Entamoeba histolytica* & *Entamoeba dispar* DNA from cysts present in stool specimens by polymerase chain reaction: its field application in the Philippines. **Parasitology Research** v.82 n.7 p.585-589, 1996.

ROBINSON, G.L. The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. **Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v.62 n.2 p.285-294, 1968.

ROCHELLE, P.A.; DE LEON, R.; STEWART, M.H., WOLFE, R.L. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. **Applied and Environmental Microbiology** v.63 n.1 p.106-114, 1997.

ROSENBLATT, J.E., SLOAN, L.M. e BESTROM, J.E. Evaluation of enzyme-linked immunoassay for the detection in serum of antibodies to *Entamoeba histolytica*. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease** v.22 n.3 p.275-278, 1995.

ROY, S., KABIR, M., MONDAL, D., ALI, I.K., PETRI JR., W.A. e HAQUE, R. Real-time PCR assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. **Journal of Clinical Microbiology** v.43 n.5 p.2168-2172, 2005.

RYAN, U., XIAO, L., READ, C., ZHOU, L., LAL, A.A. & PAVLASEK, I. Identification of Novel *Cryptosporidium* Genotypes from the Czech Republic. **Appl Environ Microbiol** v.67 n.7 p.4302 – 4307, 2003.

RYAN, U., CACCIO, S.M., Zoonotic potential of *Giardia*. **Int. J. Parasitol.** v.43 n.12 p.943–956, 2013.

SAGI, E.F.; SHAPIRO, A.M.; DECKELBAUM, R.J. *Giardia lamblia*: prevalence, influence on growth and symptomatology in healthy nursery children. **Israel Journal of Medical Sciences** v.19 n.9 p.815-817, 1983.



SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York, 3ª Ed. v.1 e 2, 2001.

SANCHEZ-GILLEN, M.C., VELAZQUEZ-ROJAS, M., SALGADO-ROSAS, H., TORRES-RASGADO, E., PEREZ FUENTES, R., MARTINEZ-MUNGUIS, J. e TALAMAS-ROHANA, P. Seroprevalence of anti-*Entamoeba histolytica* antibodies by IHA and ELISA assay in blood donors from Puebla. **Mexico. Archives of Medical Research** v.31 n.4 Suppl. p.S53-S54, 2000.

SANTÍN, M.; TROUT, J.M.; XIAO, L.; ZHOU, L.; GREINER, E.; FAYER, R. Prevalence and age related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. **Veterinary Parasitology** v.122 n.2 p.103–117, 2004.

SANTÍN, M.; TROUT, J.M.; FAYER, R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. **Veterinary Parasitology** v.146 n.1-2 p.17-24, 2007.

SANTÍN, M.; ZARLENGA, D.S. A multiplex polymerase chain reaction assay to simultaneously distinguish *Cryptosporidium* species of veterinary and public health concern in cattle. **Veterinary Parasitology** v.166 n.1-2 p.32-37, 2009.

SANTOS, S.A.; MERLINI, L.S. Prevalência de enteroparasitoses na população do município de Maria Helena, Paraná. **Ciência e Saúde Coletiva**. v.15 n.3 p.899-905, 2010.

SARGEAUNT, P.G., WILLIAMS, J.E. e GRENE, J.D. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. **Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v.72 n.5 p.519-521, 1978.

SARGEAUNT, P.G., JACKSON, T.F., WIFFEN, S., BHOJNANI, R., WILLIAMS, J.E., FELMINGHAM, D., GOLDMEIR, D., ALLASON-JONES, E., MINDEL, A. e PHILLIPS, E. The reliability of *Entamoeba histolytica* zymodemes in clinical laboratory diagnosis. **Archives of Investigation Medical** v.18 n. p.69-75, 1987.

SCORZA, A.V.; BREWER, M.M.; LAPPIN, M.R. Polymerase chain reaction for the detection of *Cryptosporidium* in cat feces. **The Journal of Parasitology** v.89 n.2 p.423-426, 2003.

SEYDEL, K.B., LI, E., ZHANG, Z. e STANLEY JR, S.L. Epithelial cell-mediated inflammation plays a crucial role in early tissue damage in amebic infection of human intestine. **Gastroenterology** v.115 n.6 p.1446-1453, 1998.

SHAMSUZZAMAN, S.M., HAQUE, R., HASIN, S.K. e HASHIGUCHI, Y. Evaluation of indirect fluorescent antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of hepatic amoebiasis in Bangladesh. **Journal of Parasitology** v.86 n.3 p.611-615, 2000.

SHARP, S.E., SUAREZ, C.A., DURAN, Y. e POPPITI, R.J. Evaluation of the Triage Micro Parasite Panel for detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*/

*Entamoeba dispar* and *Cryptosporidium parvum* in patient stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology** v.39 n.1 p.332-334, 2001.

SHEEHAN, D.J., BOTTONE, E.J., PAVLETICH, K. e HEATH, M.C. *Entamoeba histolytica*: efficacy of microscopic, cultural and serological techniques for laboratory diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology** v.10 n.2 p.128-133, 1979.

SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal for Parasitology** v.27 n.10 p.1135-1145, 1997.

SMITH, H. Diagnostics. In: FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Boca Raton, FL: CRC Press, 2<sup>a</sup> Ed. cap.6 p.173-208, 2007.

SMITH, H.V.; NICHOLS, R.A.B. *Cryptosporidium*: Detection in water and food. **Experimental Parasitology** v.124 n.1 p.61-79, 2010.

SNYDER, S.P., ENGLAND, J.J., MCCHESENEY, A.E. Cryptosporidiosis in immunodeficient Arabian foals. **Vet. pathol.** v.15 n.1 p.12-17, 1978.

SOGAYAR, M.I.T.L.; GUIMARÃES, S. Giardia lamblia. In: NEVES, D.P., et al. **Parasitologia humana**. São Paulo : Atheneu, 10<sup>a</sup>Ed. cap.14 p.107–113, 2000.

SOGAYAR, R. Giardiase. In: FERREIRA, A.W., ÁVILA, S.L. M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2<sup>a</sup>Ed. cap.23 p.250-254, 2001.

SOMMERFELT, I.E.; CARDILLO, N.; LÓPEZ, C.; RIBICICH, M.; GALLO, C.; FRANCO, A. Prevalence of *Toxocara cati* and other parasites in cats faeces collected from the open spaces of public institutions: Buenos Aires, Argentina. **Veterinary Parasitology**. v.140 n.3-4 p.296-301, 2006.

SPANO, F.; PUTIGNANI, L.; McLAUHLIN, J.; CASEMORE, D.P.; CRISANTI, A. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. **FEMS Microbiology Letters** v.150 n.2 p.209-217, 1997.

STANLEY, S.L., JR., BECKER, A., KUNZ-JENKINS, C., FOSTER, L. e LI, E. Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v.87 n.13 p.4976-4978, 1990.

STANLEY, S.L.,. Amoebiasis. **The Lancet** v.361 n.9362 p.1025-1034, 2003.

STARK, D., SEBASTIAN, J., VAN HAL, S., MATTHEWS, G., HARKNESS, J. & DEBORAH, M. Invasive amebiasis in men who have sex with men, Australia. **Emerging Infectious Disease** v.14 n.7 p.1025-1034, 2008.

SULAIMAN I. M.; MORGAN U. M.; THOMPSON R. C. A.; LAL A. A.; XIAO L.. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton

heat shock protein (HSP70) gene. **Appl. Environ. Microbiol.**; v.66 n.6 p.2385-2391, 2000.

SULAIMAN I. M.; LAL A. A.; XIAO L.. Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. **J. Parasitol.** v.88 n.2 p.388-394, 2002.

SUNNOTEL, O.; LOWERY, C.J.; MOORE, J.E.; DOOLEY, J.S.G.; XIAO, L.; MILLAR, B.C.; ROONEY, P.J.; SNELLING, W.J. *Cryptosporidium*. **Letters in Applied Microbiology** v.43 n.3 p.7-16, 2006.

TACHIBANA, H., KOBAYASHI, S., TAKEKOSHI, M. e IHARA, S. Distinguishing pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* by polymerase chain reaction. **Journal of Infectious Diseases** v.164 n.1 p.825-826, 1991.

TACHIBANA, H., KOBAYASHI, S., OKUZAWA, E. e MASUDA, G. Detection of pathogenic *Entamoeba histolytica* DNA in liver abscess fluid by polymerase chain reaction. **International Journal of Parasitology** v.22 n.8 p.1193-1196, 1992.

TACHIBANA, H., KOBAYASHI, S., NAGAKURA, K., KANEDA, Y. e TAKEUCHI, T. Asymptomatic cyst passers of *Entamoeba histolytica* but not *Entamoeba dispar* in institutions for the mentally retarded in Japan. **Parasitology International** v.49 n.1 p.31- 35, 2000.

TAKAHASHI, T., GAMBOA-DOMINGUEZ, A., GOMEZ-MENDEZ, T.J., REMES, J.M., MARTINEZ-GONZALEZ, D., GUTIERREZ- SALDIVAR, J., MORALES, J.C., GRANADOS, J. e SIERRA-MADERO, J. Fulminant amoebic colitis: analysis of 55 cases. **Disease of Colon and Rectum** v.40 n.11 p.1362- 1367, 1997.

TANRIVERDI S.; ARSLAN M. O.; AKIYOSHI DE; TZIPORI S.; WIDMER G.; Identification of genotypically mixed *Cryptosporidium parvum* populations in humans and calves. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.130 n.1 p.13-22, 2003.

TANYUKSEL, M. e PETRI JR., W.A. Laboratory diagnosis of amoebiasis. **Clinical Microbiology Review** v.16 n.4 p.713- 729, 2003.

TANYUKSEL, M., ULUKANLIGIL, M., GUCLU, Z., ARAZ, E., KORU, O., PETRI JR., W.A. Two cases of rarely recognized infection with *Entamoeba moshkovskii*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v.76 n.4 p.723-724, 2007.

TENGGU, S.A. e NORHAYATI, M. Public health and clinical importance of amoebiasis in Malaysia: A review. **Tropical Biomedicine** v.28 n.2 p.194–222, 2011.

THOMPSON, R.C.A.; CONSTANTINE, C.C.; MORGAN, U.M. Overview and significance of molecular methods: what role for molecular epidemiology? **Parasitolog** v.117 Supll.p.161-175, 1998.

THOMPSON, R.C.A.; HOPKINS, R.M.; HOMAN, W.L. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. **Parasitology Today** v.16 n.5 p.210- 213, 2000.

THOMPSON, R.C.; CHALMERS, R.M. Cryptosporidium: from molecules to disease. **Trends in Parasitology** v.18 n.3 p.98-100, 2002.

THOMPSON, R.C.A.; PALMER, C.P.; O'HANDLEY, R. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. **Veterinary Journal**, v.177 n.1 p.18-25, 2008.

THOMPSON, R.C.A., MONIS, P., *Giardia*-from genome to proteome. **Adv. Parasitol.** v.78 p.57–95, 2012.

TRAUB, R.J., INPANKAEW, T., REID, S.A., SUTTHIKORNCHAI, C., SUKTHANA, Y., ROBERTSON, I.D., THOMPSON, R.C., Transmission cycles of *Giardia duodenalis* in dogs and humans in Temple communities in Bangkok – a critical evaluation of its prevalence using three diagnostic tests in the field in the absence of a gold standard. **Acta Trop.** v.111 n.2 p.125–132, 2009.

TROLL, H., MARTI, H. e WEISS, N. Simple differential detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fresh stool specimens by sodium acetateacetic acid formalin concentration and PCR. **Journal of Clinical Microbiology** v.35 n.1 p.1701-1705, 1997.

TROTZ-WILLIAMS, L.A.; MARTIN, D.; GATEI, W.; CAMA, V.; PEREGRINE, A.S.; MARTIN, S.W.; NYDAM, D.V.; JAMIESON, F.; XIAO, L. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. **Parasitology Research** v.99 n.4 p.346-352, 2006.

TSAI, J.J., SUN, H.Y., KE, L.Y., TSAI, K.S., CHANG, S.Y., HSIEH, S.M., HSIAO, C.F., YE., J.H., HUNG, C.C. e CHANG, S.C. Higher seroprevalence of *Entamoeba histolytica* infection is associated with human immunodeficiency virus type 1 infection in Taiwan. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v.74 n.6 p.1016-1019, 2006.

TSHALAIA, L.E. On a species of *Entamoeba* detected in sewage effluents. **Medical Parazitology (Moscow)** v.10 n.1 p.244- 252, 1941.

TYZZER, E.E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** v.5 n.1 p.12-13, 1907.

TZIPORI S., WARD H.; Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes Infections** v.4 n.10 p.1047-1058, 2002.

UNGAR, B. L. P. Cryptosporidiosis in humans (*Homo sapiens*). In: DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; FAYER, R. L.. **Cryptosporidiosis of Man and Animal**. Boston: CRC Press, p.59-82, 1990.

VERONESI, R.; FOCACCIAR, R. **Tratado de infectologia**. Editora Atheneu, 4ª Ed., São Paulo, 2320 p.,1997.

VERONESI F.; PASSAMONTI F.; CACCIO S.; DIAFERIA M.; PIERGILI FIORETTI D. Epidemiological survey on equine *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in Italy and molecular characterization of isolates. **Zoonoses Public Health** v.57 n.7-8 p.510-517 2010.

VERWEIJ, J.J., BLOTKAMP, J., BRIENEN, E.A., AGUIRRE, A. e POLDERMAN, A.M. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* cysts using polymerase chain reaction on DNA isolated from faeces with spin columns. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases** v.19 n.5 p.358- 361, 2000.

VERWEIJ JJ, POLDERMAN AM, CLARK CG Genetic variation among human isolates of 652 uninucleated cyst-producing *Entamoeba* species. **J Clin Microbiol** v.39 n.4 p.1644-1646, 2001.

VERWEIJ, J.J.; OOSTVOGEL, F.; BRIENEN, E.A.T.; NANG-NEIFUBAH, A.; ZIEM, J.; POLDERMAN, A.M. Prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in northern Ghana. **Tropical Medicine & International Health** v.8 n.12 p.1153-1156, 2003.

VERWEIJ, J.J., BLANGE, R.A., TEMPLETON, K., SCHINKEL, J., BRIENEN, E.A., VAN ROOYEN, M.A., VAN LIESHOUT, L. e POLDERMAN, A.M. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology** v.42 n.3 p.1220-1223, 2004.

VREDEN, S.G.S., VISSER, L.G., VERWEIJ, J.J., BLOTKAMP, J., STUIVER, P.C., AGUIRRE, A. e POLDERMAN, A.M. Outbreak of amoebiasis in a family in The Netherlands. **Clinical Infectious Diseases** v.4 n.37 p.1101-1104, 2000.

WEGAYEHU, T., ADAMU, H., PETROS, B., Prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* species infections among children and cattle in North Shewa Zone, Ethiopia. **BMC Infect. Dis.** v.13 n.419 p.1471-2334, 2013.

WALSH, J.A.. Problems in recognition and diagnosis of amoebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. **Review of Infectious Disease** v.8 n.2 p.228-238, 1986.

WANG, L.T., JEN, G. e CROSS, J.H. Establishment of *Entamoeba histolytica* from liver abscess in monoxenic cultures with hemoflagellates. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v.22 n.1 p.30-32, 1973.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Amoebiasis. **Wkly. Epidemiol. Rec.** v.72 n.1 p.97- 100, 1997.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for Drinking-water Quality**. v.1: 3ª Ed., 2004.

WIDMER, G.; LIN, L.; KAPUR, V.; FENG, X.; ABRAHAMSEN, M.S. Genomics and genetics of *Cryptosporidium parvum*: the key to understanding cryptosporidiosis. **Microbes and Infections** v.4 n.10 p.1081-1090, 2002.

WONSIT, R., THAMMAPALERD, N., THARAVANIJ, S., RADOMYOS, P. e BUNNAG, D. Enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of *Entamoeba histolytica* antigens in fecal specimens. **Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v.86 n.2 p.166-169, 1992.

XIAO, L., J. R. LIMOR, L. LI, U. MORGAN, R. C. THOMPSON, AND A. A. LAL.. Presence of heterogeneous copies of the small subunit rRNA gene in *Cryptosporidium parvum* human and marsupial genotypes and *Cryptosporidium felis*. **J. Eukaryot. Microbiol.** v.46 n.5 p.44S-45S, 1999.

YI CHEN, YUNZHI, Z., BIN, Y., TANGKAI, Q., HONGZHOU, L., XUNJIA, C. & HIROSHI, T. Seroprevalence of *Entamoeba histolytica* infection in HIV-infected patients in China. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v.77 n.5 p.825- 828, 2007.

YODER, J.S.; BEACH, M.J. *Cryptosporidium* surveillance and risk factors in the United States. **Experimental Parasitology** v.124 n.1 p.31-39, 2010.

ZAMAN, S., KHOO, J., NG, S.W., AHMED, R., KHAN, M.A., HUSSAIN, R. e ZAMAN, V. Direct amplification of *Entamoeba histolytica* DNA from amoebic liver abscess pus using polymerase chain reaction. **Parasitology Research** v.86 n.9 p.724-728, 2000.

ZENGZHU, G., BRACHA, R., NUCHAMOWITZ, Y., CHENG, W. e MIRELMAN, D. Analysis by enzyme-linked immunosorbent assay and PCR of human liver abscess aspirates from patients in China for *Entamoeba histolytica*. **Journal of Clinical Microbiology** v.37 n.9 p.3034-3036, 1999.

ZHANG, P., LIU, Y., ALSARAKIBI, M., LI, J., LIU, T., LI, Y., LI, G., Application of HRM assays with EvaGreen dye for genotyping *Giardia duodenalis* zoonotic assemblages. **Parasitol. Res.** v.111 n.5 p.2157–2163, 2012.

ZINDROU, S., OROZCO, E., LINDER, E., TELLEZ, A. e BJORKMAN, A. Specific detection of *Entamoeba histolytica* DNA by hemolysin gene targeted PCR. **Acta Tropica** v.78 n.2 p.117-125, 2001.