

A amebíase deveria detectar-se com metodologias diagnósticas mais económicas e específicas

Cheaper, more specific diagnostic procedures recommended to detect amoebiasis

Fred Luciano Neves Santos

Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-PE), Pernambuco, Brasil.

Acceda a este artículo en siicsalud

Código Respuesta Rápida
(Quick Response Code, QR)



www.siicsalud.com/dato/arsiiic.php/137823

Recepción: 10/6/2014 - Aprobación: 10/11/2014
Primera edición, www.siicsalud.com: 5/12/2014

Enviar correspondencia a: Fred L. Neves Santos, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Campus Universitário da UFPE, Cidade Universitária, Recife-Pernambuco (PE), Brasil, CEP50670-420. fred.santos@cpqam.fiocruz.br



+ Versión extensa, especialidades médicas relacionadas, producción bibliográfica y referencias profesionales del autor.

Abstract

Amoebiasis is a parasitic infection caused by protozoa Entamoeba histolytica and represents a serious health problem in areas where hygiene conditions and treatment of water supply are unsatisfactory. An estimate suggests that approximately 500 million people are infected globally each year and that up to 100 000 deaths per year can be attributed to complications caused by amoebiasis. The laboratory diagnosis of amoebiasis is performed by traditional light microscopy by demonstrating cysts and/or trophozoites in faeces. However, its ability to detect interspecies variation within E. histolytica, Entamoeba dispar and Entamoeba moshkovskii species is limited, making a presumptive diagnosis impossible. Immunological methods used to search for anti-E. histolytica antibodies are able to distinguish the species E. histolytica, E. dispar and E. moshkovskii species, although false-positive and false-negative results could be provided. Similarly, the search for specific antigens by immunologic tools is limited. Chain reaction polymerase is the method of choice for amoebiasis diagnosis, however new methodologies were employed to make an amoebiasis diagnosis and have been giving promising results. Similarly, real time PCR and magnetic beads-based technologies were used for amoebiasis diagnosis and have demonstrated an excellent performance. Despite the advances in laboratory amoebiasis diagnosis over the years, it is necessary to develop cheaper methodologies that are specific to the E. histolytica and which can be used in clinical laboratories worldwide to replace the obsolete methodologies used currently.

Key words: amoebiasis, diagnosis, *Entamoeba histolytica*

Resumo

A (La) amebíase é uma (es una) infecção parasitária causada pela (por) *Entamoeba histolytica*, protozoário que representa um risco à saúde nos (un riesgo para la salud en los) países onde as (donde las) barreiras sanitárias são inadequadas. Estima-se que 500 milhões de indivíduos em todo o mundo estejam (se encuentran) infectados por este patógeno, havendo até (hay hasta) 100 000 óbitos anuais (muertes anuales). O (El) diagnóstico laboratorial é realizado rotineiramente através da (rutinariamente por medio de la) demonstração microscópica de cistos e/ou (o) trofozoítos no (en el) sedimento fecal, não permitindo a (no permitiendo la) detecção de variações interespecíficas entre a *E. histolytica* e espécies não patogênicas como a *Entamoeba dispar* e a (y) *Entamoeba moshkovskii*. Metodologias imunológicas para a pesquisa de anticorpos contra a (la búsqueda de anticuerpos contra) *E. histolytica* já foram usadas e são (ya fueron utilizadas y son) capazes de diferenciar as espécies do (entre las especies del) complexo *E. histolytica/dispar/moshkovskii*, apesar de apresentarem resultados falso positivos e negativos. De modo semelhante a pesquisa de antígenos específicos por técnicas imunológicas são de utilidade limitada. A reação em cadeia da (La reacción en cadena de la) polimerase ainda constitui a metodologia de escolha para o (todavía es la metodología de elección para el) diagnóstico específico da amebíase, entretanto metodologias mais recentes foram empregadas no (fueron empleadas en el) diagnóstico da amebíase levando a resultados promissores (promisorios). A PCR em tempo real e as tecnologias baseadas na (basadas en la) detecção de microesferas magnéticas acopladas foram utilizadas para o diagnóstico da amebíase e apresentaram bom desempenho. Apesar do avanço no (del avance en el) diagnóstico laboratorial da amebíase ao longo dos anos, ainda há necessidade do desenvolvimento de (a lo largo de los años, todavía hay necesidad de desarrollar) uma metodologia barata e específica para a *E. histolytica* que possa ser utilizada nos laboratórios clínicos em todo o mundo em substituição às (de las) técnicas ultrapassadas utilizadas até hoje (hasta hoy).

Palavras-chave: amebíase, diagnóstico, *Entamoeba histolytica*

Introdução

A (La) amebíase é uma (es una) infecção parasitária global causada pelo (por el) protozoário *Entamoeba histolytica*, possui (tiene) distribuição cosmopolita e representa um risco à saúde nos (un riesgo para la salud en los) países onde as (donde las) barreiras sanitárias são inadequadas.¹ Os indivíduos mais comumente acometidos são aqueles que possuem baixo (infectados son aquellos con bajo) poder aquisitivo, desnutrição e imunossupressão. Estima-se que 500 milhões de indivíduos em todo o mundo estejam (están) infectados pela (por) *E. histolytica*,² havendo entre 40 000 a 100 000 óbitos anuais (muertes anuales).³

A infecção assintomática é a forma mais comum da doença e ocorre em (es la manifestación más común de la enfermedad y se presenta en) cerca de 90% dos casos. Os demais casos são sintomáticos e caracterizados, principalmente, pela disenteria amebiana. Es-

ta discrepância clínica tem sido tema de discussão há muitos anos (hace ya muchos años). Em 1993 a espécie foi redescrita em dois (fue descrita nuevamente en dos) organismos, deixando o antigo nome (manteniendo el nombre antiguo) *E. histolytica* para a patogênica e criando uma nova designação para aquela não (una nueva denominación para aquella no) patogênica (*Entamoeba dispar*).⁴ A *E. dispar* vive como um comensal estável e avirulento (huésped estable y no virulento) produzindo um estado de portador assintomático, sendo aproximadamente nove vezes mais (nueve veces más) prevalente que a *E. histolytica*.⁵ Além da (Además de) *E. dispar*, outras espécies de ameba são capazes de colonizar o homem e não produzir ações patogênicas, tais como a (al ser humano y no producir acciones patogénicas, tales como) *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba coli* e *Entamoeba moshkovskii*.

O diagnóstico clínico da amebíase é presuntivo e os sinais e (*es presuntivo y los signos y*) sintomas são inespecíficos, podendo ser confundidos com os de outras (*como los de otras*) infecções intestinais. O diagnóstico laboratorial é realizado rotineiramente através da (*de rutina por medio de la*) demonstração microscópica de cistos e/ou trofozoítos no (*en el*) sedimento fecal, não permitindo a detecção de variações interespecíficas entre a *E. histolytica* e espécies não patogênicas.⁶ Indivíduos infectados pelas espécies não patogênicas não requerem tratamento e a quimioterapia inadequada ou desnecessária devem (*o innecesaria deben*) ser evitadas por causarem importantes efeitos adversos,^{7,8} elevação de custos ao sistema (*costos al sistema*) de saúde e possibilidade do desenvolvimento de resistência às (*aparición de resistencia a las*) drogas comumente utilizadas.^{9,10} O diagnóstico espécie-específico é relevante não apenas para os (*no sólo para los*) indivíduos sintomáticos, mas também para todos os (*como también para todos los*) infectados devido à facilidade de transmissão pelo contato pessoa-pessoa (*por el contacto persona a persona*), especialmente em países em desenvolvimento onde as condições de higiene são precárias (*donde las condiciones de higiene son precarias*). Com base no exposto (*Basándose en lo expuesto*), um diagnóstico laboratorial barato e específico para a *E. histolytica* representa um desafio para comunidade científica, dada a importância do tratamento dos indivíduos verdadeiramente infectados por este patógeno.

O objetivo desta revisão foi descrever as principais metodologias disponíveis para o diagnóstico da amebíase, suas vantagens e (*sus ventajas y*) limitações, bem como as (*así como las*) perspectivas para o desenvolvimento de novas metodologias.

Microscopia óptica

A análise microscópica para pesquisa de cistos é a ferramenta mais (*es la herramienta más*) utilizada no diagnóstico da amebíase. Sua execução é (*Su ejecución resulta*) simples, barata e não (*y no*) exige equipamentos sofisticados. No entanto, é (*Sin embargo, es*) incapaz de diferenciar a *E. histolytica* da *E. dispar* e *E. moshkovskii*. Por esta razão, a Organização Mundial da Saúde (OMS) propõe que o (*sugiere que el*) diagnóstico da amebíase baseado nesta metodologia deva referir-se à (*debe referirse a la*) infecção causada pelo complexo *E. histolytica/dispar/moshkovskii*.¹¹ Apesar de um resultado positivo para o complexo o indivíduo infectado não deve ser submetido à (*no debe someterse al*) tratamento quimioterápico.

A *E. histolytica* apresenta duas formas morfológicas distintas: cistos e trofozoítos. Em espécimes fecais a fresco (*fecales frescos*), os trofozoítos são mais (*son más*) frequentemente observados por seu (*su*) extenso pleomorfismo em sua superfície e emissão de pseudópodes, os quais arrastam o corpo da ameba e o seu (*que arrastran el cuerpo de la ameba y su*) núcleo, que nem sempre é visível (*que no siempre es visible*) (Figura 1A). Medem (*Miden*) entre 12 e 60 µm de diâmetro, em média um pouco mais de 20 µm. No centro do núcleo há uma (*En el centro del núcleo hay una*) pequena massa de cromatina, denominada cariossoma central (Figura 1B).

Geralmente, observam-se eritrócitos no citoplasma de trofozoítos de *E. histolytica*.¹⁸⁻²¹ No entanto, trofozoítos de *E. dispar* eventualmente podem apresentar eritrócitos fagocitados.¹⁵ Eritrócitos recentemente ingeridos aparecem como corpos (*cuerpos*) refringentes, de cor esverdeada muito (*color verdoso muy*) pálida. O diagnóstico

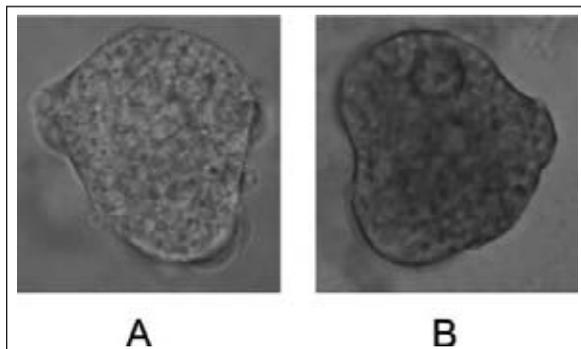


Figura 1. (A) Trofozoíto de *E. histolytica* cultivado em meio polixênico de Pavlova. Observar as protrusões laterais para a formação de pseudópodes. (B) Trofozoíto de *E. histolytica* cultivada em meio polixênico de Pavlova corada pelo lugol. Observar características do núcleo. Fotos do autor.

através da pesquisa (*de la búsqueda*) de trofozoítos ocorre somente em (*tiene lugar sólo bajo*) condições disentericas e a demora no (*y la demora en el*) processamento do material fecal implica na redução da sensibilidade do teste, pois os (*del análisis, ya que estos*) mesmos permanecem viáveis por até 3 horas após sua (*por hasta 3 horas luego de su*) eliminação.^{13,16,17} Já os (*En ese momento, los*) cistos podem ser facilmente reconhecidos em preparações coradas pelo lugol por sua parede (*teñidas con lugol por su pared*) hialínica refringente. São geralmente esféricos, mas podem ter (*pero pueden tener*) forma ligeiramente ovoides ou irregular, variam de 10 a 20 µm de diâmetro e contêm de um a quatro núcleos no seu (*y contienen de uno a cuatro núcelos en su*) interior. O citoplasma torna-se verde-amarelado na presença (*se vuelve verde-amarillento en presencia*) de vacúolos de glicogênio que se coram de castanho-amarelado (*se tiñen de castaño-amarillento*); a membrana nuclear e o cariossoma são ligeiramente visíveis e coram-se de castanho-claro (Figura 2).

A microscopia óptica possui baixa (*tiene baja*) sensibilidade (cerca de 60%) e pode produzir resultados falso-positivos. De fato (*De hecho*), diversos fatores podem afetar os (*pueden afectar los*) resultados como o atraso no processamento do material, analista mal treinado (*la demora para el procesamiento del material, el analista mal entrenado*), dificuldade na diferenciação de trofozoítos não móveis (*no móviles*) de células epiteliais, uso de coletores (*recolectores*) contaminados, presença de substâncias interferentes como antibióticos, laxantes, antiácidos, antidiarreicos ou enemas, número inadequado de amostras fecais analisadas (*muestras fecales analizadas*), preservação inadequada das amostras e liberação intermitente de cistos e/ou trofozoítos.^{6,18,19} Embora as (*Aunque las*) técnicas de concentração auxiliem o diagnóstico microscópico nem sempre é (*no siempre resulta*) possível visualizar as amebas no sedimento fecal.²⁰ Apesar de todas estas desvantagens, a microscopia óptica é uma metodologia barata, rápida e bastante útil em estudos de triagem.

Deteção de anticorpos circulantes

A detecção de anticorpos é uma ferramenta que pode auxiliar o diagnóstico da amebíase. Entretanto, indivíduos residentes em áreas endêmicas estão constantemente expostos à infecção, tornando o (*haciendo al*) diagnóstico incapaz de distinguir infecções recentes de anteriores devido à persistência de anticorpos circulantes.^{21,22} Estes testes possuem resultado mais fidedigno quando são utilizados em áreas não (*en áreas no*) autóctones.²³⁻²⁵ De

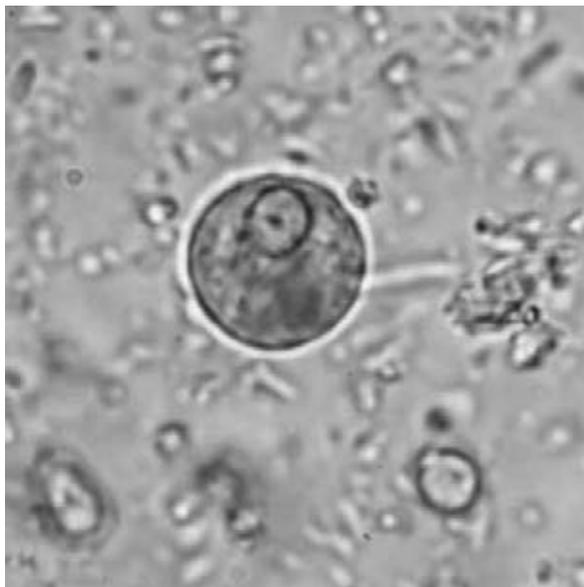


Figura 2. Cisto de *E. histolytica/dispar/moshkovskii* corado pelo lugol. Observar características do núcleo e presença de parede celular envolvendo o parasito. Fonte: DPDX/CDC - Atlanta - EUA.

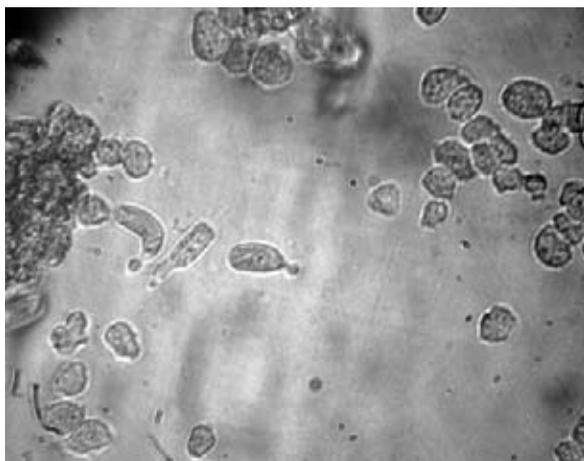


Figura 3. Trofozoítos em meio de cultivo polixênico de Pavlova em fase exponencial de crescimento. Observar intenso pleomorfismo das células e presença de bactérias no meio. Foto do autor.

todo modo, a combinação de testes sorológicos com a detecção do parasito (pesquisa de antígenos ou PCR) oferece uma maior (*una mayor*) sensibilidade diagnóstica.²⁶

Anticorpos séricos anti-*E. histolytica* podem ser detectados em 75%-80% dos indivíduos com infecção sintomática. Os métodos mais (*Los métodos más*) utilizados para esta finalidade incluem: ELISA,²⁷⁻³⁴ hemaglutinação indireta,^{28,35-38} contraímunoelctroforese,^{35,39-43} dentre outros. Os testes de ELISA pesquisam a presença de anticorpos IgM ou IgG anti-lectinas,^{21,44} o que representa uma desvantagem no início (*una desventaja al comienzo de la*) da infecção. Anticorpos específicos começam a ser produzidos somente uma semana após aparecimento da (*sólo una semana luego de la aparición de la*) sintomatologia.⁴⁵ Um estudo utilizando 100 indivíduos portadores de colite amebiana mostrou que os anticorpos IgM e IgG anti-lectina, dosados por ELISA, apresentaram uma sensibilidade de 45.1% e 5.6%, respectivamente, quando pesquisados na primeira semana após aparecimento dos sintomas clínicos. No entanto, sofreram (*sufrieron un*) aumento para 79.3% e 93.1%, respectivamente, após um período superior a uma semana depois do apareci-

mento dos sintomas clínicos.⁷⁸ Estes dados (*Estos datos*) demonstram que os testes de ELISA utilizados para pesquisa de anticorpos podem fornecer (*pueden mostrar*) resultados falso-negativos nos primeiros dias de infecção. Além do mais (*Además*), resultados falso-positivos podem ocorrer devido à colonização do lúmen (*pueden producirse debido a la colonización de la luz*) intestinal pela *E. dispar* pois, segundo alguns (*según algunos*) autores, este protozoário é capaz (*es capaz*) de estimular a secreção (*la secreción*) de anticorpos anti-lectina.^{46,47}

Apesar destas limitações, o ELISA é um dos (*es uno de los*) métodos mais utilizados em todo o mundo. É amplamente empregado para o (*Es ampliamente empleado para el*) diagnóstico da amebíase, principalmente nos casos de abscessos hepáticos. Segundo alguns autores, a sensibilidade do teste chega a (*de la prueba llega a*) 100%,^{28,48} sendo um teste de escolha (*y es un análisis de elección*) para diagnóstico de abscessos hepáticos: 95% dos indivíduos com esta apresentação clínica possuem altos níveis séricos de IgG anti-*E. histolytica*, por volta de uma semana após o aparecimento dos (*alrededor de una semana después de la aparición de los*) sintomas.⁴⁹ Ainda que possua (*Aun con*) alta sensibilidade, o ELISA pode produzir resultados falso-negativos. Nestes casos, os testes devem (*En estos casos, los análisis deben*) ser repetidos ou confirmados através de outras metodologias.

Detecção de antígenos

Pesquisa de coproantígenos

São vários os (*Son varios los*) testes utilizados para detecção de antígenos na amebíase. Dentre estes, o ELISA possui vantagens quando comparado a outras (*cuando se lo compara con otras*) metodologias comumente utilizadas, pois é capaz (*porque es capaz*) de diferenciar a infecção causada pela *E. histolytica* da colonização intestinal provocada pelas espécies não patogênicas, possui valores elevados de sensibilidade e especificidade, e o uso de placas com (*y el uso de placas con*) 96 poços (*pocillos*) permite a realização de estudos epidemiológicos em larga escala.⁵⁰

Na pesquisa (*En la búsqueda*) de antígenos, além do (*además del*) material fecal, outras amostras podem (*otras muestras pueden*) ser usadas para detecção da *E. histolytica* como saliva, soro e (*suero y*) fluido de abscessos hepáticos. Haque e cols. e Abd-All e cols. diagnosticaram a maioria de seus pacientes utilizando o teste de ELISA específico para lectinas de *E. histolytica* no fluido dos (*en el líquido de los*) abscessos hepáticos e na saliva de indivíduos portadores de abscessos hepáticos, respectivamente.^{44,51}

As principais vantagens destes testes são sua (*Las ventajas principales de estas pruebas son su*) praticidade e altos valores de sensibilidade e especificidade. No entanto, estas metodologias são limitadas para pesquisa de antígenos em amostras fecais congeladas ou (*o*) preservadas, pois os (*pues los*) antígenos podem ser desnaturados (*desnaturalizados*) durante o processo de fixação do (*fijación del*) espécime a ser estudado. Além disso, não há estudos (*Además, no existen estudios*) que demonstrem que cistos presentes em fezes (*heces*) formadas sejam reconhecidos (*son reconocidos*) por esta metodologia, pois não seriam (*porque no serían*) capazes (*de*) expressar lectinas em sua superfície, como ocorre nas formas trofozoíticas.

Pelo exposto há uma (*Por todo lo expuesto, existe una*) variedade de métodos capazes de distinguir a infecção causada pela *E. histolytica* da colonização pela *E. dispar*

ou *E. moshkovskii*. Alguns deles são capazes de realizar a diferenciação específica, no entanto possuem (*en tanto presentan*) sensibilidade e especificidade variadas, muitas vezes havendo necessidade da realização de testes mais sensíveis como a reação (*como la reacción*) de amplificação de ácidos nucleicos ou identificação por meio (*o identificación por medio*) de *beads* recobertas por antígenos espécie-específicos.

Amplificação de ácidos nucleicos

A PCR é uma técnica que reproduz a habilidade natural de replicação do DNA, possui boa (*tiene buena*) reprodutibilidade, alta sensibilidade e especificidade, sendo capaz e detectar um único trofozoíto por mg de fezes.⁵² Vem sendo bastante utilizada em substituição à microscopia óptica, cultura e até mesmo aos testes (*cultivo y hasta las pruebas*) de ELISA.⁵³ Outra vantagem é a possibilidade de diferenciar as espécies pertencentes ao (*las especies que pertenecen al*) complexo⁵⁴ e de utilizar outros materiais biológicos, além de espécimes fecais.⁵⁵⁻⁵⁸ Por estes motivos, a PCR é a metodologia recomendada pela OMS para o diagnóstico da amebíase. A despeito das inúmeras vantagens (*Además de las numerosas ventajas*) apresentadas, a PCR também possui limitações. Tecnicamente é mais complexa e sua execução mais demorada que o ELISA, possui custo (*tiene costo*) elevado durante seu processo de implantação, dificultando sua utilização no diagnóstico de rotina, principalmente em países em desenvolvimento.^{13,26} Além do mais, deve-se levar em consideração que é uma (*se debe considerar que es una*) técnica susceptível à contaminação e, consequentemente, a resultados falso-positivos. Somado a isso, resultados falso-negativos são passíveis de ocorrer em (*pueden producirse, en*) virtude da presença de inibidores inespecíficos presentes nas amostras fecais.³⁴ A análise dos dados deve ser realizada por indivíduos treinados (*entrenados*), com experiência nesta metodologia e é bastante laboriosa, pois há (*es bastante complicada, pues conlleva la*) necessidade de preparação de géis de agarose corados pelo (*teñidos por el*) brometo de etídio, uma substância cancerígena (Figura 4).

A realização da PCR deve ser precedida por metodologias de concentração de cistos, dada à liberação intermitente de cistos nas amostras fecais. Diversas técnicas de concentração já foram descritas na (*ya fueron descritas en la*) literatura. A concentração de cistos utilizando formol/éter ou formol/acetato de etila é a metodologia de escolha (*es la metodología de elección*) para esta finalidade.⁵⁹⁻⁶¹ Os métodos de extração de DNA das amostras fecais e a utilização de iniciadores específicos constituem o ponto chave (*un punto clave*) para um diagnóstico seguro. Existem vários métodos de extração de DNA; os que utilizam colunas cromatográficas são os que fornecem maior (*son los que manifiestan mayor*) quantidade de material genético livrando-os de inibidores inespecíficos da DNA polimerase.⁶² Outros métodos de extração também podem ser empregados com sucesso (*empleados con éxito*), como o método do fenol/clorofórmio.⁶³ A principal vantagem destas metodologias é a (*de estas metodologías es la*) possibilidade de se trabalhar com amostras fixadas (*con muestras fijadas*) em formol.^{64,65} A fixação em formol em concentrações que variam de 1% a 10% é muito importante para a preservação e não diminui a (*y no disminuye la*) capacidade de amplificação da PCR em um período de até (*hasta*) 7 dias.⁶⁶

Diversas variantes da PCR foram utilizadas, apresentando bons resultados, como a PCR multiplex,^{34,61} a PCR em

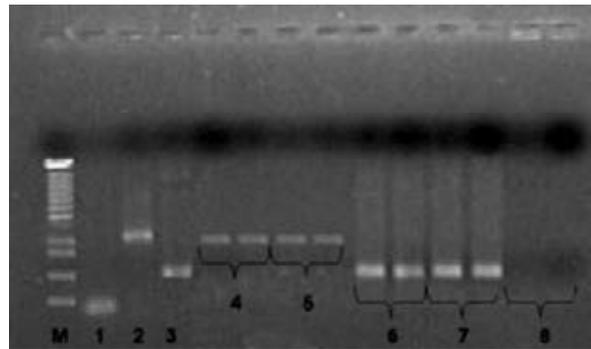


Figura 4. Gel de agarose corado com brometo de etídio mostrando análise de amostras positivas para o complexo *E. histolytica/dispar* pela PCR multiplex. M - marcador de peso molecular de 100 pb; Linha 1 - controle negativo; Linha 2 - controle positivo para *E. histolytica* (427 pb); Linha 3 - controle positivo para *E. dispar* (195 pb); Linhas 4 e 5 - amostras positivas para *E. histolytica*; Linhas 6 e 7 - amostras positivas para *E. dispar*; Linha 8 - amostra negativa para o complexo *E. histolytica/dispar*.³⁴

tempo real⁶⁷ e a amplificação aleatório de DNA polimórfico (RAPD).⁶⁸ A PCR em tempo real, por exemplo, combina o princípio da PCR convencional com um mecanismo de detecção e quantificação por meio de fluorescência. Esta metodologia possui vantagem sobre a PCR convencional por permitir que a amplificação, detecção e quantificação do material genético ocorram em uma única etapa, agilizando a obtenção dos (*la obtención de los*) resultados, diminuindo o risco (*disminuyendo el riesgo*) de contaminação e, consequentemente, proporcionando maior confiabilidade nos resultados. Além disso, a PCR em tempo real gera (*genera*) resultados numéricos, os quais são mais fáceis (*los cuales son más fáciles*) de interpretar do que a visualização dos fragmentos amplificados em géis corados, como ocorre na (*en geles teñidos, como sucede en la*) PCR convencional. Com base nestas (*De acuerdo con estas*) características, esta metodologia apresenta maior sensibilidade para detectar a *E. histolytica* e diferenciá-las de espécies não patogênicas quando comparada à PCR convencional.⁶⁹

Detecção de antígenos por meio de microesferas (*beads*) magnéticas

A tecnologia para detecção de antígenos em amostras (*en muestras*) biológicas por meio de microesferas magnéticas constitui um sistema analítico, do tipo multiplex, baseado em três (*basado en tres*) elementos principais: o suporte sólido, os marcadores fluorescentes e um fluxo (*y un flujo*) fluorimétrico.

Este método tem sido empregado para a (*ha sido empleado para la*) detecção e diferenciação de diversas espécies de vírus, fungos, protozoários e estruturas antigênicas.⁷⁰⁻⁷⁹ O sistema Luminex para detecção de *E. histolytica* foi recentemente estabelecido com sensibilidade e especificidade entre 83% e 100% em comparação com a PCR em tempo real.⁸⁰ Recentemente Navidad e cols.⁷⁹ validaram um teste laboratorial multiplex baseado na metodologia do Luminex para detecção de patógenos gastrintestinais causadores de diarreia aguda. Após validação do (*Con posterioridad a la validación del*) teste os autores observaram encurtamento no (*acortamiento en el*) tempo de identificação de múltiplos patógenos em uma única reação com um tempo de resposta (*con un tiempo*) menor que 6 h desde o momento do recebimento dos espécimes fecais. O ácido nucleico de *E. histolytica* foi detectado em 29 amostras que anteriormente não havia sido diagnosticado por meio da microscopia óptica. A PCR em tempo real foi capaz de amplificar somente

(solamente) 5 destas 29 amostras. Apesar do excelente desempenho do Luminex frente às demais metodologias usadas para o diagnóstico da amebíase os autores afirmaram que outros estudos precisam ser realizados para justificar tamanha discrepância.

Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas para os demais patógenos analisados, como os vírus (adenovírus, rotavírus e norovírus), *Cryptosporium* spp. e algumas bactérias entéricas, os quais apresentaram altos valores de sensibilidade (90%-100%) e especificidade (99%-100%). De modo semelhante, Santos e cols.⁷⁰ descreveram o desenvolvimento de uma técnica multiplex de hibridização direta usando a tecnologia Luminex, para uma detecção rápida e simultânea da *E. histolytica* e de amebas não patogênicas. Neste estudo, os (En ese estudio, los) produtos da PCR foram produzidos com sondas biotiniladas e misturadas às (y mezcladas a las) microesferas previamente acopladas a sondas capazes de distinguir as espécies de *Entamoeba*. Em seguida, os produtos da PCR foram incubados com estreptovidina-ficoeritrina, os quais ligaram a (que ligaron la) biotina nos produtos amplificados da PCR. De acordo com estes autores, a metodologia Luminex é uma ferramenta capaz de detectar e distinguir espécies de *Entamoeba*, ainda que em misturas (aun en mezclas) complexas. Portanto, esta metodologia pode ser usada para melhorar o diagnóstico da amebíase bem como ser (así como es) uma importante ferramenta em estudos que objetivam investigar a circulação das diversas espécies de *Entamoeba* no mundo.

A tecnologia Luminex apresenta diversas vantagens quando comparada às demais. Utiliza volumes reduzidos de amostra e analisa de diversos parâmetros em uma única amostra, graças à marcação interna das (gracias a la marcación interna de las) esferas. O tempo de análise é curto e pode-se fazê-la em muitas amostras ao (es corto y puede ser realizada al) mesmo tempo. Por ser um sistema aberto esta tecnologia permite ao analista clínico realizar o diagnóstico do que desejar (de lo que se quiera). Apesar da utilização desta tecnologia ser sedutora a priori, ela apresenta limitações de ordem técnica e econômica que inviabilizam seu emprego (inhabilitan su uso) como teste diagnóstico em países em desenvolvimento. De fato, o custo do (De hecho, el costo del) equipamento e dos insumos não é negligenciável (no es despreciable). Outra desvantagem é a impossibilidade de detectar anticorpos de diferentes isotipos em uma mesma mistura reacional. Apesar do ganho de tempo ao (A pesar de la ganancia de tiempo al) realizar diversas análises simultaneamente em uma única amostra, a etapa de contagem das esferas é mais longa que a leitura da (conteo de las esferas es más largo que la lectura de la) densidade ótica no ELISA convencional. Enquanto um leitor (Mientras un lector) de microplacas efetua a medida fotométrica de 96 poços em três segundos, o fluorímetro de fluxo necessita de 10 a 90 segundos para adquirir um número suficiente de medidas de fluorescência em uma mistura reacional.

Perspectivas e conclusão

Apesar do avanço no (Aun con el avance en el) diagnóstico laboratorial da amebíase, os laboratórios clínicos con-

tinuam utilizando rotineiramente a (en forma rutinaria la) microscopia óptica e, muitos deles, não evidenciam em seus laudos a (en sus informes la) informação de que o indivíduo está infectado por uma das três (por una de las tres) espécies do complexo *E. histolytica/dispar/moshkovskii*, e sim somente pela *E. histolytica*. Aliado a este fato (Sumado a este hecho), médicos desatualizados desconhecem (desactualizados desconocen) esta informação e tratam os pacientes sem a confirmação da espécie. Daí a (De ahí la) importância do desenvolvimento de uma metodologia barata, de fácil aplicação e que seja (y que sea) capaz de efetuar um diagnóstico espécie-específico. Por isso que a (Por este motivo, la) combinação de metodologias como a pesquisa de anticorpos circulantes, em caso de doença (en caso de enfermedad) invasiva, e a pesquisa de antígenos por meio da PCR deve ser preconizada com o objetivo de aumentar a assertividade diagnóstica. Dados epidemiológicos e avaliações (y evaluaciones) auxiliares como a colonoscopia, a biópsia de lesões intestinais e, no (y, en el) caso de abscesso hepático, a avaliação do fluido pela PCR não devem ser negligenciados e podem (no deben ser ignorados y pueden ayudar con la) auxiliar na conclusão diagnóstica. O desenvolvimento de ferramentas moleculares do tipo multiplex, incluindo a PCR em tempo real e a tecnologia Luminex, encontra-se em evidência e vem apresentando (y presentan) resultados promissores por serem (promisorios) capazes de reduzir o tempo para a (por ser capaces de reducir el tiempo para la) conclusão diagnóstica, terem capacidade de detecção de vários patógenos utilizando pequenos volumes de amostra e efetuarem o (y realizar el) diagnóstico diferencial das espécies pertencentes ao complexo além (al complejo, además) de outros patógenos intestinais como protozoários, vírus e bactérias. Entretanto, a despeito de todos estes (a pesar de todos estos) benefícios, o impacto econômico destas tecnologias representa uma limitação ao seu uso nos (de su uso en los) países onde a amebíase representa um problema de Saúde Pública.

A busca de novos marcadores deve ser estimulada. Uma alternativa seria o isolamento (sería el aislamiento) de proteínas específicas para cada uma das três (una de las tres) espécies do complexo, a produção de anticorpos monoclonais e a padronização do teste por meio de (de la prueba por medio de la) imunocromatografia por fluxo lateral, a qual poderia (la cual podría) ser utilizada em campo por um custo acessível até por (por un valor accesible hasta para) países economicamente menos favorecidos. Mais ideal ainda seria se essas proteínas fossem expressas ou secretadas (Sería ideal si esas proteínas fueran expresadas o segregadas) por cistos e trofozoítos, favorecendo o diagnóstico de indivíduos sintomáticos e dos portadores sãos (y de los portadores sanos). Assim, torna-se (Así, resulta) evidente que o diagnóstico da amebíase constitui um desafio para a comunidade científica, posto que há (puesto que existe la) necessidade do desenvolvimento de metodologias que forneçam (brinden) informações seguras sobre a saúde da população a um preço acessível a todos (la salud de la población con costos accesibles para todos).

Lista de abreviaturas y siglas

OMS, Organización Mundial de la Salud; RAPD, amplificación aleatoria de ADN polimórfico.

Cómo citar este artículo

Neves Santos FL. A amebiasis deveria detectar-se com metodologias diagnósticas mais econômicas e específicas. *Salud i Ciencia* 21(1):65-71, Nov 2014.

How to cite this article

Neves Santos FL. Cheaper, more specific diagnostic procedures recommended to detect amoebiasis. *Salud i Ciencia* 21(1):65-71, Nov 2014.

Autoevaluación del artículo

La amebiasis es una parasitosis provocada por *Entamoeba histolytica*. El diagnóstico fundamentado en técnicas morfológicas es presuntivo; la diferenciación entre especies solamente se realiza por técnicas de biología molecular o con anticuerpos específicos contra *E. histolytica*.

La identificación de quistes tetranucleados en extendidos de materia fecal mediante microscopia óptica es indicador de:

A, *Entamoeba histolytica*; B, *Entamoeba dispar*; C, *Entamoeba moshkovskii*; D, Todas son correctas; E, Ninguna es correcta.

Verifique su respuesta en www.siicsalud.com/dato/evaluaciones.php/137823

Bibliografía

- Ravdin JI. Amebiasis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 20(6):1453-1464; quiz 1465-1466, 1995.
- Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 8(2):228-38, 1986.
- WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997. *Epidemiol Bull* 18(1):13-4, 1997.
- Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol* 40(3):340-4, 1993.
- Allason-Jones E, Mindel A, Sargeant P, Williams P. *Entamoeba histolytica* as a commensal intestinal parasite in homosexual men. *N Engl J Med* 315(6):353-6, 1986.
- Haque R, Petri WA Jr. Diagnosis of amebiasis in Bangladesh. *Arch Med Res* 37(2):273-6, 2006.
- Hari A, Srikanth BA, Lakshmi GS. Metronidazole induced cerebellar ataxia. *Indian J Pharmacol* 45(3):295-7, 2013.
- Seto K, Knowles SR, Weber EA. Immediate hypersensitivity reaction induced by metronidazole. *Ann Pharmacother* 46(5):763-4, 2012.
- Samarawickrema NA, Brown DM, Upcroft JA, Thammapalerd N, Upcroft P. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *J Antimicrob Chemother* 40(6):833-40, 1997.
- Wassmann C, Hellberg A, Tannich E, Bruchhaus I. Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. *J Biol Chem* 274(37):26051-6, 1999.
- WHO Expert Committee. *Amebiasis* 72(14):97-100, 1997.
- Gonin P, Trudel L. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 41(1):237-41, 2003.
- Tanyuksel M, Petri WA Jr. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 16(4):713-29, 2003.
- Espinosa-Cantellano M, González-Robles A, Chávez B, Castañón G, Argüello C, Lázaro-Haller A, et al. *Entamoeba dispar*: ultrastructure, surface properties and cytopathic effect. *J Eukaryot Microbiol* 45(3):265-72, 1998.
- Haque R, Neville LM, Hahn P, Petri WA Jr. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. *J Clin Microbiol* 33(10):2558-61, 1995.
- Gardner BB, Del Junco DJ, Fenn J, Hengesbaugh JH. Comparison of direct wet mount and trichrome staining techniques for detecting *Entamoeba* species trophozoites in stools. *J Clin Microbiol* 12(5):656-8, 1980.
- Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. *Clin Microbiol Rev* 20(3):511-532, 2007.
- Petri WA Jr, Haque R, Lyster D, Vines RR. Estimating the impact of amebiasis on health. *Parasitol Today Pers Ed* 16(8):320-1, 2000.
- Rashed SM, Nasr ME-S, Abd-Allah KF, Eraky MA, Nagieb MM. Comparative study between PCR and microscopic examination in diagnosing *Entamoeba histolytica*. *J Egypt Soc Parasitol* 41(1):89-98, 2011.
- McMillan A, McNeillage GJ. Comparison of the sensitivity of microscopy and culture in the laboratory diagnosis of intestinal protozoal infection. *J Clin Pathol* 37(7):809-11, 1984.
- Gathiram V, Jackson TF. A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *South Afr Med J Suid-Afr Tydskr Vir Geneesk* 72(10):669-72, 1987.
- Caballero-Salcedo A, Viveros-Rogel M, Salvatierra B, Tapia-Conyer R, Sepulveda-Amor J, Gutierrez G, et al. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 50(4):412-9, 1994.
- Ohnishi K, Murata M. Present characteristics of symptomatic amebiasis due to *Entamoeba histolytica* in the east-southeast area of Tokyo. *Epidemiol Infect* 119(3):363-7, 1997.
- Walderich B, Weber A, Knobloch J. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from German travelers and residents of endemic areas. *Am J Trop Med Hyg* 57(1):70-4, 1997.
- Weinke T, Friedrich-Jänicke B, Hopp P, Janitschke K. Prevalence and clinical importance of *Entamoeba histolytica* in two high-risk groups: travelers returning from the tropics and male homosexuals. *J Infect Dis* 161(5):1029-31, 1990.
- Haque R, Ali IK, Akther S, Petri WA Jr. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Microbiol* 36(2):449-52, 1998.
- Tandon A. Use of enzyme linked immunosorbent assay in intestinal and extra-intestinal amoebiasis (amoebic liver abscess). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75(4):574-5, 1981.
- Knobloch J, Mannweiler E. Development and persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica* in patients with amoebic liver abscess. Analysis of 216 cases. *Am J Trop Med Hyg* 32(4):727-32, 1983.
- Osorio LM, Picó T, Luaces A. Circulating antibodies to histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*, in amoebic liver abscess patients. *Parasitology* 105 (Pt 2):207-10, 1992.
- Lotter H, Mannweiler E, Tannich E. Crude or recombinant proteins applied to latex agglutination, complement fixation and enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of invasive amebiasis. *Trop Med Parasitol Off Organ Dtsch Tropenmedizinische Ges Dtsch Ges Für Tech Zusammenarbeit* GTZ 44(4):277-80, 1993.
- Lotter H, Jackson TF, Tannich E. Evaluation of three serological tests for the detection of anti-amoebic antibodies applied to sera of patients from an area endemic for amebiasis. *Trop Med Parasitol Off Organ Dtsch Tropenmedizinische Ges Dtsch Ges Für Tech Zusammenarbeit* GTZ 46(3):180-2, 1995.
- Braga LL, Lima AA, Sears CL, Newman RD, Wuhib T, Paiva CA, et al. Seroepidemiology of *Entamoeba histolytica* in a slum in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 55(6):693-7, 1996.
- Pal S, Sengupta K, Manna B, Sarkar S, Bhattacharya S, Das P. Comparative evaluation of somatic & excretory-secretory antigens of *Entamoeba histolytica* in serodiagnosis of human amoebiasis by ELISA. *Indian J Med Res* 104:152-6, 1996.
- Santos FLN, Gonçalves M de S, Soares NM. Validation and utilization of PCR for differential diagnosis and prevalence determination of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* in Salvador City, Brazil. *Braz J Infect Dis* 15(2):119-125, 2011.
- Shetty N, Das P, Pal SC, Prabhu T. Observations on the interpretation of amoebic serology in endemic areas. *J Trop Med Hyg* 91(4):222-7, 1988.
- Cummins AJ, Moody AH, Laloo K, Chiodini PL. Rapid latex agglutination test for extraluminal amoebiasis. *J Clin Pathol* 47(7):647-8, 1994.
- Hung CC, Chen PJ, Hsieh SM, Wong JM, Fang CT, Chang SC, et al. Invasive amoebiasis: an emerging parasitic disease in patients infected with HIV in an area endemic for amoebic infection. *AIDS Lond Engl* 13(17):2421-8, 1999.
- Karki BM, Parija SC. Co-agglutination test for the detection of circulating antigen in amoebic liver abscess. *Am J Trop Med Hyg* 60(3):498-501, 1999.
- Krupp IM. Comparison of counterimmunoelectrophoresis with other serologic tests in the diagnosis of amebiasis. *Am J Trop Med Hyg* 23(1):27-30, 1974.
- Sheehan DJ, Bottone EJ, Pavletich K, Heath MC. *Entamoeba histolytica*: efficacy of microscopic, cultural, and serological techniques for laboratory diagnosis. *J Clin Microbiol* 10(2):128-33, 1979.
- Stevens DL, Taylor RG, Everett ED, Owensby L, McNitt TR. Amoebic liver abscess. Report of a case presenting with nonreactive serologic tests for *Entamoeba histolytica*. *Am J Gastroenterol* 72(3):234-8, 1979.
- Bapat MM, Bhavé GG. Counterimmunoelectrophoresis in the immunodiagnosis of amoebiasis. *J Postgrad Med* 36(3):124-7, 1990.
- Restrepo MI, Restrepo Z, Elsa Villareal CL, Aguirre A, Restrepo M. Diagnostic tests for amoebic liver abscess: comparison of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and counterimmunoelectrophoresis (CIE). *Rev Soc Bras Trop Med* 29(1):27-32, 1996.
- Haque R, Mollah NU, Ali IK, Alam K, Eubanks A, Lyster D, et al. Diagnosis of amoebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. *J Clin Microbiol* 38(9):3235-9, 2000.
- Abd-Alla MD, Jackson TG, Ravdin JI. Serum IgM antibody response to the galactose-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg* 59(3):431-4, 1998.
- Jackson TF, Gathiram V, Simjee AE. Seroepidemiological study of antibody responses to the zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *Lancet* 1(8431):716-9, 1985.
- Jetter A, Walderich B, Britten D, Mete O, Göral V, Burchard GD, et al. An epidemiological study of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* infection in eastern Turkey using a colorimetric polymerase chain reaction. *Arch Med Res* 28 Spec No:319-21, 1997.
- Zengzhu G, Bracha R, Nuchamowitz Y, Cheng-I W, Mirelman D. Analysis by enzyme-linked immunosorbent assay and PCR of human liver abscess aspirates from patients in China for *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* 37(9):3034-6, 1999.
- Abd-Alla MD, el-Hawey AM, Ravdin JI. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect anti-adherence protein antibodies in sera of patients with invasive amebiasis in Cairo, Egypt. *Am J Trop*

Med Hyg 47(6):800-4, 1992.

50. Gonzalez-Ruiz A, Haque R, Rehman T, Aguirre A, Hall A, Guhl F, et al. Diagnosis of amebic dysentery by detection of *Entamoeba histolytica* fecal antigen by an invasive strain-specific, monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 32(4):964-70, 1994.

51. Abd-Alla MD, Jackson TF, Reddy S, Ravdin JL. Diagnosis of invasive amebiasis by enzyme-linked immunosorbent assay of saliva to detect amebic lectin antigen and anti-lectin immunoglobulin G antibodies. *J Clin Microbiol* 38(6):2344-7, 2000.

52. Katzwinkel-Wladarsch S, Loscher T, Rinder H. Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from stool specimens. *Am J Trop Med Hyg* 51(1):115-8, 1994.

53. Sanuki J, Asai T, Okuzawa E, Kobayashi S, Takeuchi T. Identification of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* cysts in stool by polymerase chain reaction. *Parasitol Res* 83(1):96-8, 1997.

54. El Bakri A, Samie A, Ezzedine S, Odeh RA. Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* in fecal samples by nested PCR in the United Arab Emirates (UAE). *Acta Parasitol Witold Stefanski Inst Parasitol Warszawa Pol* 58(2):185-90, 2013.

55. Acuna-Soto R, Samuelson J, De Girolami P, Zarate L, Millan-Velasco F, Schoolnick G, et al. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg* 48(1):58-70, 1993.

56. Britten D, Wilson SM, Mc Nerney R, Moody AH, Chiodini PL, Ackers JP. An improved colorimetric PCR-based method for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in feces. *J Clin Microbiol* 35(5):1108-11, 1997.

57. Evangelopoulos A, Spanakos G, Patsoula E, Vakalis N, Legakis N. A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces. *Ann Trop Med Parasitol* 94(3):233-40, 2000.

58. Zaman S, Khoo J, Ng SW, Ahmed R, Khan MA, Hussain R, et al. Direct amplification of *Entamoeba histolytica* DNA from amoebic liver abscess pus using polymerase chain reaction. *Parasitol Res* 86(9):724-8, 2000.

59. Ridley DS, Hawgood BC. The value of formalin concentration of faecal cysts and ova. *J Clin Pathol* 9(1):74-6, 1956.

60. Troll H, Marti H, Weiss N. Simple differential

detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fresh stool specimens by sodium acetate-acetic acid-formalin concentration and PCR. *J Clin Microbiol* 35(7):1701-5, 1997.

61. Evangelopoulos A, Legakis N, Vakalis N. Microscopy, PCR and ELISA applied to the epidemiology of amebiasis in Greece. *Parasitol Int* 50(3):185-9, 2001.

62. Verweij JJ, Blotkamp J, Brienen EA, Aguirre A, Polderman AM. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* cysts using polymerase chain reaction on DNA isolated from faeces with spin columns. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 19(5):358-61, 2000.

63. Gomes MA, Pesquero JB, Furst C, Valle PR, Pesquero JL, Silva EF. An improved method to distinguish *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Parasitology* 119 (Pt 4):359-62, 1999.

64. Rivera WL, Tachibana H, Silva-Tahat MR, Uemura H, Kanbara H. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* DNA from cysts present in stool specimens by polymerase chain reaction: its field application in the Philippines. *Parasitol Res* 82(7):585-9, 1996.

65. Rivera WL, Kanbara H. Detection of *Entamoeba dispar* DNA in macaque feces by polymerase chain reaction. *Parasitol Res* 85(6):493-5, 1999.

66. Ramos F, Zurabian R, Morán P, Ramiro M, Gómez A, Clark CG, et al. The effect of formalin fixation on the polymerase chain reaction characterization of *Entamoeba histolytica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93(3):335-6, 1999.

67. Roy S, Kabir M, Mondal D, Ali IKM, Petri WA Jr, Haque R. Real-time-PCR assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Microbiol* 43(5):2168-72, 2005.

68. Valle PR, Souza MBG, Pires EM, Silva EF, Gomes MA. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA and DNA in *Entamoeba histolytica*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 42(5):249-53, 2000.

69. Lau YL, Anthony C, Fakhrurrazi SA, Ibrahim J, Ithoi I, Mahmud R. Real-time PCR assay in differentiating *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* infections in Orang Asli settlements in Malaysia. *Parasit Vectors* 6(1):250, 2013.

70. Santos HLC, Bandyopadhyay K, Banea R, Peralta RHS, Peralta JM, Da Silva AJ. Luminex®: a new technology for the simultaneous identification of five *Entamoeba* spp. commonly found in human stools. *Parasit Vectors* 6:69, 2013.

71. Pérez-Flores I, Santiago JL, Calvo-Romero N, Ba-

rrientos-Guzmán A, Sánchez-Frustruoso AI. Different Impact of Pretransplant Anti-HLA Antibodies Detected by Luminex in Highly Sensitized Renal Transplanted Patients. *Bio Med Res Int* 2013:738404, 2013.

72. Sehr P, Rubio I, Seitz H, Putzker K, Ribeiro-Müller L, Pawlita M, et al. High-throughput pseudovirion-based neutralization assay for analysis of natural and vaccine-induced antibodies against human papillomaviruses. *PLoS One* 8(10):e75677, 2013.

73. Wessels E, Rusman LG, van Bussel MJAWM, Claas ECJ. Added value of multiplex Luminex Gastrointestinal Pathogen Panel (xTAG®) GPP) testing in the diagnosis of infectious gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*, 2013.

74. Thierry S, Hamidjaja RA, Girault G, Löfström C, Ruuls R, Sylviane D. A multiplex bead-based suspension array assay for interrogation of phylogenetically informative single nucleotide polymorphisms for *Bacillus anthracis*. *J Microbiol Methods* 95(3):357-65, 2013.

75. Christopher-Hennings J, Araujo KPC, Souza CJH, Fang Y, Lawson S, Nelson EA, et al. Opportunities for bead-based multiplex assays in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc* 25(6):671-91, 2013.

76. Schweighardt AJ, Battaglia A, Wallace MM. Detection of Anthrax and Other Pathogens Using a Unique Liquid Array Technology. *J Forensic Sci*, 2013.

77. Foti L, Fonseca B de PF e, Nascimento LD, Marques C de FS, da Silva ED, Duarte CAB, et al. Viability study of a multiplex diagnostic platform for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(Suppl.1):136-41, 2009.

78. Gognimbou MK, Hernández-Neuta I, Panaiotov S, Bachiyska E, Palomino JC, Martin A, et al. Tuberculosis-spoligo-rifampin-isoniazid typing: an all-in-one assay technique for surveillance and control of multidrug-resistant tuberculosis on Luminex devices. *J Clin Microbiol* 51(11):3527-34, 2013.

79. Navidad JF, Griswold DJ, Gradus MS, Bhattacharyya S. Evaluation of Luminex xTAG gastrointestinal pathogen analyte-specific reagents for high-throughput, simultaneous detection of bacteria, viruses, and parasites of clinical and public health importance. *J Clin Microbiol* 51(9):3018-24, 2013.

80. Taniuchi M, Verweij JJ, Noor Z, Sobuz SU, Lieshout L van, Petri WA Jr, et al. High throughput multiplex PCR and probe-based detection with Luminex beads for seven intestinal parasites. *Am J Trop Med Hyg* 84(2):332-7, 2011.

Curriculum Vitae abreviado del autor



Fred Luciano Neves Santos. Graduado em Farmácia-Bioquímica, Mestrado em Patologia Humana, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil. Tecnologista em Saúde Pública, com perfil Diagnóstico Laboratorial e Suporte a Pesquisa em Doenças Parasitárias e Infecciosas, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (Fiocruz-PE), Recife, Brasil. Gerente da qualidade, Serviço de Referência em Doença de Chagas, experiência em diagnóstico parasitológico e molecular das parasitoses humanas. Doutorando do curso de Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde da Fiocruz-PE, desenvolvimento de quimeras para diagnóstico da doença de Chagas.