

JULIANA ALVES GARCIA

**PESQUISA DE *DIENTAMOEBIA FRAGILIS* EM
PACIENTES COM HIV/AIDS UTILIZANDO A
TÉCNICA DE HEMATOXILINA FÉRRICA SIMPLIFICADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Infectologia em Saúde Pública.

Orientador: Prof.Dr. Sérgio Cimerman

**SÃO PAULO
2010**

JULIANA ALVES GARCIA

**PESQUISA DE *DIENTAMOEBIA FRAGILIS* EM
PACIENTES COM HIV/AIDS UTILIZANDO A
TÉCNICA DE HEMATOXILINA FÉRRICA SIMPLIFICADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde - PPG-CCD - SES para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Infectologia em Saúde Pública.

Orientador: Prof.Dr. Sérgio Cimerman

**SÃO PAULO
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Garcia, Juliana Alves

Pesquisa de *Dientamoeba fragilis* em pacientes com HIV/AIDS utilizando a técnica de hematoxilina férrica simplificada / Juliana Alves Garcia - São Paulo, 2010.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Infectologia em Saúde Pública

Orientador: Sérgio Cimerman

1. *Dientamoeba* 2. Diarréia 3. Síndrome de imunodeficiência adquirida 4. Hematoxilina/uso diagnóstico

SES/CCD/CD-227/10

*“Se eu puder diminuir o sofrimento ou
aliviar a dor de alguém, ou ajudar um
pássaro ferido a voltar para o seu ninho,
não terei vivido em vão..”
(Emily Dickinson)*

Aos meus pais **Roberto** e **Maria Antonia** por me haver ensinado e impresso, em minha alma, todo o conhecimento essencial ao ser humano de amor, respeito, retidão, dedicação e equilíbrio, que representam as colunas que sustentam um templo: Minha vida.

Aos meus irmãos **Fábio**, **Fernando** e **Leonardo** por me apoiar no caminho das conquistas.

Aos meus tios **Helena**, **Cido**, **Clélia** e **Célia** e aos meus primos **Wander** e **Rose**, **Davison** e **Edilene** e ao meu avô, **Arthur** pelo interminável carinho e confiança. Vocês são fundamentais para a minha vida.

A todas as pessoas portadoras do HIV e a todos aqueles que, de alguma forma, sentem-se diferentes ou com qualquer tipo de enfermidade.
Meu mais profundo respeito e admiração.

Agradeço, primeiramente, a **DEUS** por ter me iluminado e concedido todas as conquistas de minha vida e originada de sua própria.

Minha eterna devoção.

Ao meu Orientador, Dr. **Sérgio Cimerman** por me apoiar e dividir comigo seus conhecimentos; por ter-me acalmado nos momentos de “desespero”, abraçando o desafio de acreditar em mim.

Dissertação terminada e não posso deixar de agradecer a todas as pessoas que participaram de sua realização. Algumas, sempre fizeram parte da minha vida, torcendo e apoiando minhas escolhas e decisões. Outras chegaram, aos poucos e foram de extrema importância para que eu ao término dessa jornada.

Meus sinceros agradecimentos à:

Wilma Assunção Iuliano e a **Marisa AP. Rocha** do laboratório de Parasitologia do Instituto de Infectologia Emílio Ribas sem elas a parte prática deste trabalho não existiria, bem como a todos os funcionários do Instituto Emílio Ribas. OBRIGADA!

A todos **meus amigos** por entenderem minha ausência em alguns momentos e pelo eterno apoio.

Aos colegas da Pós-Graduação que tornaram esta etapa mais agradável: **Manú, Andrey, Ricardo, Fernanda, Sônia, Viviane, Clementina, Andréia, Maria Rita e Angela**.. um grande beijo a todos.

Às secretárias **Mônica** e **Margareth**, pela eficiência e paciência. Obrigada!

Aos pacientes portadores de aids, que lutam a cada dia para superar todos os obstáculos impostos por esta enfermidade. A todos eles, que se tornaram a razão de minha profissão, e minha perpétua dedicação e agradecimento.

Aos Professores do curso pelo empenho e seriedade na profissão de ensinar, imprimindo seus conhecimentos na vida dos alunos que passam por suas mãos.

RESUMO

RESUMO

A diarreia, manifestação clínica comum em pacientes acometidos pela AIDS, pode levar a óbito em decorrência do diagnóstico tardio e da falta de tratamento adequado. Uma das causas de diarreia em pacientes com AIDS é atribuída ao *Dientamoeba fragilis*, cuja etiologia envolve diversos fatores, com a prevalência de patógenos emergentes e oportunistas, como: vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e outros agentes virais, bacterianos e fúngicos. Este estudo avaliou a eficiência da coloração de hematoxilina férrica simplificada na identificação da *Dientamoeba fragilis*, bem como verificou a prevalência do protozoário associada a causas de diarreia em pacientes com HIV/AIDS. A pesquisa contemplou 82 pacientes com idade compreendida entre 18 e 61 anos (idade média de 38 anos), com predominância do gênero masculino (75,6%), acompanhados no Instituto de Infectologia “Emílio Ribas”, de setembro de 2006 a novembro de 2008. Das amostras coletadas, com emprego de técnicas especiais de coloração (Hematoxilina Férrica), comparando-se a outros métodos com solução conservante Schaudinn, métodos coproparasitológicos (Hoffman, Pons e Janer, 1934; Richie, 1948). A técnica de hematoxilina férrica simplificada detectou a *Dientamoeba fragilis* em 1,2% das amostras, sendo que as outras técnicas não foram capazes de detectar o protozoário. Concluiu-se que a coloração de hematoxilina férrica simplificada mostrou-se eficaz na detecção da *Dientamoeba fragilis*, é uma técnica rápida e prática para diagnóstico em laboratório de rotina, quando comparada com outros métodos de coloração. A *Dientamoeba fragilis* foi associada a uma das causas de diarreia em pacientes aidéticos.

PALAVRAS-CHAVE: 1. *Dientamoeba fragilis*; 2. Diarreia; 3. AIDS; 4. Hematoxilina férrica simplificada.

ABSTRACT

ABSTRACT

Diarrhea is a common clinical manifestation in HIV/AIDS infected patients and, most often, the delay in the diagnosis and the lack of adequate treatment can lead to the death. Studies strongly indicate *Dientamoeba fragilis* as one of the causes of diarrhea in HIV/AIDS infected patients. The etiology must come from various factors and, different from the immune competent individuals, emergent and opportunist pathogens prevail such as the participation of the human immunodeficiency virus (HIV), viral and bacterial and fungal infections.

D. fragilis is a protozoan which presents world-wide distribution causing non-invasive diarrhea in humans. Described for the first time by Jepps and Dobell in 1918, little is known about the *Dientamoeba* genus.

The objectives of the present study were to evaluate the prevalence of *D. fragilis* associated with the causes of diarrhea in HIV/AIDS patients hospitalized at the *Instituto de Infectologia Emílio Ribas* (IIER), a hospital of Infectious and Parasitic Diseases and also a center of reference in the treatment to patients with HIV/AIDS infection in São Paulo city, Brazil.

Eighty-two AIDS patients hospitalized at the IIER have taken part of this study from September 2006 towards its end in November 2008. Feces samples collection was carried out accordingly with Schaudinn conversant solution. Coproscopic methods were performed (Hoffman, Pons and Janer; Richie; Kynion) and special techniques of coloration (Ferric Hematoxilin Simplified). Eighteen to sixty year old patients were included in this study being 37 year old the average age. Male patient participants were the majority (75.6%). In total, 105 samples were collected from the 82 patients in this study. Unprotected sex was the most frequent cause for acquisition HIV (46.3%), followed by the use of injectable or non-injectable drugs (14.6%). Heterosexual relations were the most mentioned ones (19.5%). Patients presented viral load between 49 the 750000 (average of 73849 ± 124850) and CD4 ranging from 2 to 1306 (average of 159 ± 250). Difference was found significant difference between methods, as to the result (

positive/negative) In average, the odds of the outcome to be positive with other techniques it was 2.7 times the chance of a positive result with iron hematoxylin simplified.

Difference was found significant difference between methods ($p = 0.003$). The "Other techniques" are capable to detect a significantly greater amount of parasites in compared to iron hematoxylin simplified, especially with respect to *Isospora belli*, *Cryptosporidium sp*, *Schistossoma mansoni* and *Strongyloides stercoralis*, which were not found by using the hematoxylin *Endolimax nana* and *D. fragilis* were more "detected" by Hematoxilin, and the only parasite not found by "the others methods " was *D. fragilis*.

Key words: *Dientamoeba fragilis*, diarrhea, AIDS, Iron hematoxilin simplified

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% Percentual

< Menor

> Maior

AIDS *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

CD4 *Cluster of Differentiation 4* (Grupamento de Diferenciação 4)

CV Carga Viral

DST Doenças Sexualmente Transmissíveis

g grama

HF Hematoxilina Férrica

HIV *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

IgE Imunoglobulina E

IIER Instituto de Infectologia “Emílio Ribas”

mL mililitros

OMS Organização Mundial de Saúde

rRNA Ribosomal RNA (RNA-Ribossomal)

SAME Serviço de Arquivo Médico e Estatística

SUS Sistema Único de Saúde

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

FIGURA 1. Microscopia de luz (aumento 40x) revelando <i>Dientamoeba fragilis</i> na coloração de hematoxilina férrica simplificada.	5
FIGURA 2. Microscopia de luz revelando <i>Dientamoeba fragilis</i> tamanho (100x) na coloração de hematoxilina férrica simplificada.	6
FIGURA 3. Ciclo evolutivo da <i>Dientamoeba fragilis</i>	7
FIGURA 4. Diferenciação das metodologias da HF tradicional e HF Simplificada	11
FIGURA 5. Coloração de hematoxilina férrica simplificada	29
FIGURA 6. Coloração de HFS	29
Tabela 1. Características demográficas dos 82 pacientes atendidos no IIER	34
Tabela 2. Quantidade de amostras coletadas entre os 82 pacientes do IIER no período de setembro de 2007 a novembro de 2008 para pesquisa de <i>Dientamoeba fragilis</i>	35
Tabela 3. Diferença entre os resultados (Positivo/ Negativo) entre as técnicas de HSF para pesquisa de <i>Dientamoeba fragilis</i>	36
Tabela 4. Ocorrência dos nove parasitos mais freqüentes diagnosticados entre os métodos estudados e a freqüência de <i>Dientamoeba</i> entre os 82 pacientes do estudo.	37
Tabela 5. Freqüência dos parasitos, considerando o número de ocorrências (total de pacientes) comparando os métodos de Hoffman, Ritchie e kynion	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1. <i>Dientamoeba fragilis</i>	2
1.1.1. Taxonomia	3
1.1.2. Morfologia	4
1.1.3. Ciclo Biológico e Provável Transmissão	6
1.1.4. Variedades moleculares	7
1.2. Quadro clínico	8
1.3. Diagnóstico parasitológico	9
1.3.1. Método para Coloração de Protozoário	9
1.3.2. Coloração de Hematoxilina Férrica	9
1.4. Diagnóstico imunológico	13
1.4.1. Diagnóstico Molecular	14
1.4.2. Cultura	15
1.5. Tratamento	16
1.6. Diarreia e AIDS	17
2. OBJETIVO	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Delineamento do experimento	23
3.2. Local de estudo	24
3.3. Coleta das amostras	25
3.4. Critérios de inclusão	25
3.5. Métodos coproparasitológicos	26
3.5.1 Método de Sedimentação espontânea	26
3.5.2. Centrífugo - Sedimentação pela Formalina-Éter	26
3.5.3.1. Coloração da hematoxilina férrica simplificada	27

3.5.3.2. Coloração de Kynioun	30
3.6. Análises Estatísticas	31
4. RESULTADOS	32
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÃO	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
Anexo I. Protocolo de Pesquisa nº 58/05	60
Anexo II. Folha de Aprovação do Protocolo de Pesquisa nº 58/05	62
Anexo III. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	64
Anexo IV. Soluções Utilizadas para a Técnica de Hematoxilina Simplificada	66

1. INTRODUÇÃO

1.1. *DIENTAMOEBA FRAGILIS*

Desde a sua primeira descrição em 1918, a *Dientamoeba fragilis* tem sido negligenciada enquanto alvo de pesquisas para o seu reconhecimento como um importante patógeno (Jepps, Dobell, 1918).

Segundo Girginkardesler et al. (2003), com o surgimento de um conjunto crescente de relatos de casos de vários países ao redor do mundo, com esse protozoário ligado às manifestações clínicas, tais como diarreia, dor abdominal, flatulência, anorexia e, também, como causa de síndrome de intestino irritável, colite alérgica e diarreia em pacientes com aids, poucos fatores justificam essa negligência. Embora a *Dientamoeba fragilis* seja mais comumente identificada utilizando-se esfregaços fecais, há recentes avanços nas técnicas, bem como no aprimoramento da capacidade dos pesquisadores para a sua detecção. Foram feitos progressos significativos (desenvolvimento de técnicas moleculares, colorações) na classificação biológica desse protozoário que, inicialmente, foi descrito como uma ameba por Jepps, Dobell (1918), encontrando-se, hoje, entre os protozoários flagelados devido a sua semelhança com o *Histomonas meleagridis* (flagelado parasito de aves). A transmissão desse parasito é discutível, mas é possível que esteja relacionada com a transmissão de outros parasitos intestinais, como ovos de nematodas (*Enterobius vermicularis*, por exemplo) ou transmissão direta entre homens, como descrito naqueles que têm relação sexual com outros homens, conforme relatado em estudo de coorte (Amato Neto et al, 2008).

1.1.1. Taxonomia

A denominação *Dientamoeba fragilis* deve-se ao fato de ser uma ameba entérica com uma curiosa característica binucleada, com rápida tendência à degeneração após a excreção das fezes (Jepps, Dobell, 1918).

Chatton (1925) a incluiu na família *Entamoebidae*. No entanto, dúvidas foram levantadas por Dobell (1940) quando notou, em microscopia de luz, a presença de centrômeros e uma grande similaridade de *Dientamoeba fragilis* com o *Histomonas meleagridis* (flagelado parasito de aves que determina a enteropatite dos perus) transmitido pelos ovos de um nematóide parasito de aves, o *Heterakis gallinea*, consolidando a afirmação de Dobell (1940) de que a *Dientamoeba* é uma forma aberrante de um flagelado, semelhante ao *Histomonas* (Pessoa, 1958). Essa relação foi formalizada quando Grasse (1953) retirou a *Dientamoeba* da família *Entamoebidae* e criou uma família para abrigar esses dois gêneros. Estudos realizados por Camp et al. (1974), por meio de microscopia eletrônica, confirmaram as observações de Dobell (1940) para a classificação da *Dientamoeba fragilis* como um protozoário flagelado. Dwyer (1972a, 1972b, 1974) mostrou a primeira relação com substâncias antigênicas por intermédio de métodos moleculares, entre *Dientamoeba*, *Histomona* e *Trichomonas*, e a exclusão do gênero *Entamoeba*. Utilizou-se de uma pequena seqüência do gene (cepa Bi/pa; ATCC 30948) da *Dientamoeba*, sugerindo a relação com *Dientamoeba/Histomonas* e o gênero *Trichomonas*, mas essas informações continuam a ser investigadas para confirmação.

Dwyer (1974), utilizando pequena sequência do gene (cepa Bi/pa; ATCC 30948) da *Dientamoeba* sugeriu a relação com *Dientamoeba/Histomonas* e o gênero *Trichomonas*, mas essas informações continuam a ser investigadas para confirmação. Hoje, a *Dientamoeba* está classificada no filo *Sarcomastigophora*, pertencente à classe *Zoomastigophorea*, da ordem *Trichomonadida*. Por conseguinte, a família *Entamoebidae* possui quatro gêneros de interesse: *Entamoeba*, *Iodamoeba*, *Endolimax* e *Dientamoeba* (Garcia, 2007).

1.1.2. Morfologia

Diferenças sutis na descrição morfológica da *Dientamoeba* são relatadas a partir do material fecal ou da cultura do protozoário (Wenrich, 1937).

Dobell (1940), em sua publicação original, descreveu a *Dientamoeba* a partir de material fecal no qual constatou uma forma arredondada com tamanho entre 3,5 a 12 μm , movendo-se por meio de pseudópodes volumosos e de extremidade obtusa. Relatou, ainda, que 80% dos trofozoítos, na amostra fecal, eram binucleados e 20% monucleados. O diâmetro do núcleo variava de 1 a 3 μm dependendo do tamanho do trofozoíto. Internamente, o núcleo parecia fragmentado contendo quatro a oito grânulos ausentes de cromatina periférica (Figura 1 e 2). O estudo não informou qual o material com conservante, empregado para a observação morfológica da *Dientamoeba fragilis*.

Há descrições de *Dientamoeba* a partir de cultura, uma vez que a descrição morfológica a partir de fezes não era considerada fidedigna, pois o trofozoíto degenerava-se rapidamente, além de não terem sido observados detalhes do núcleo em solução salina e preparados de iodo (Windsor, Rafay, 1997).

As descrições morfológicas confirmam a descrição de Dobell (1940) que observou que a *Dientamoeba* não possui forma cística, somente a forma trofozoítica, facilmente destruída após alguns minutos no meio exterior.

Possuem de 6 a 12 μm apresentaram de um a dois núcleos na maioria das espécies, e o seu caráter morfológico típico é na forma binucleada, sem revestimento interno de cromatina na membrana; cariossoma de localização central, composto de quatro a oito fragmentos de cromatina isolados, relativamente grandes, de coloração preta intensa, apresentando um substrato de substância opaca (Amato Neto et al., 2008).

A microscopia eletrônica também confirma os estudos de Camp et al. (1974), que descreveram uma haste extranuclear entre os núcleos polares, originando um complexo de adjacentes a um dos núcleos. A haste é composta por dois feixes de aproximadamente 30 a 40 microtúbulos, um feixe aparece a

alguma distância do núcleo que o outro e é, muitas vezes, visto na ranhura do envelope nuclear. Johnson et al. (2004) revelaram na microscopia eletrônica inclusões arredondadas no citoplasma, que, posteriormente, foram reconhecidas como grânulos digestivos. Também são comumente encontrados no citoplasma e podem conter mielina, bactérias ou amido. A *Dientamoeba* alimenta-se por fagocitose e o corpo residual é liberado nos vacúolos digestivos por exocitose.

A estrutura nuclear da *Dientamoeba* assemelha-se mais á do *Trichomonas* flagelado do que ao da *Entamoeba spp*, sendo que a cromatina ou grânulos são, muitas vezes, observados no nucleoplasma e o envelope nuclear é composto por duas membranas. Com base em estudos de microscopia eletrônica, a *Dientamoeba fragilis* foi reclassificada como uma ameboflagelado ao invés de uma ameba e está intimamente relacionada com *Histomonas* e *Trichomonas spp*.

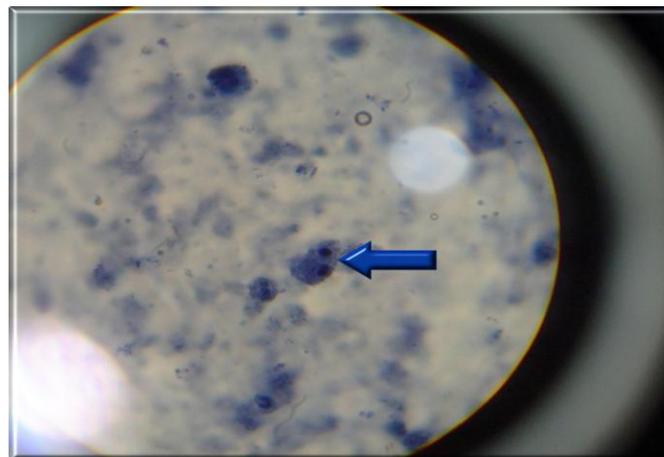


FIGURA 1. Microscopia de luz (aumento 40x) revelando *Dientamoeba fragilis* na coloração de hematoxilina férrica simplificada.

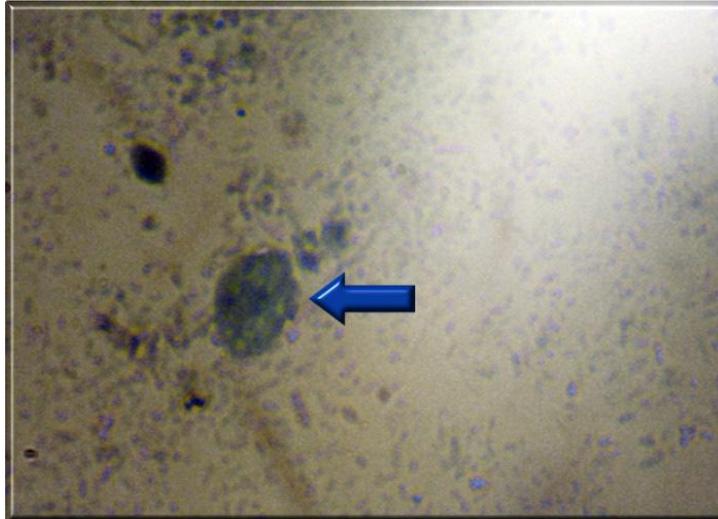


FIGURA 2. Microscopia de luz revelando *Dientamoeba fragilis* tamanho (100x) na coloração de hematoxilina férrica simplificada.

1.1.3. Ciclo Biológico e Provável Transmissão

O ciclo biológico completo de *Dientamoeba fragilis* ainda não está elucidado, mas suposições são baseadas em dados clínicos. Nos dados, o estágio de cisto não é identificado no ciclo, e o trofozoíto é o único estágio encontrado nas amostras de fezes de pessoas infectadas. Provavelmente, a *Dientamoeba* é transmitida por via fecal-oral ligados a ovos de helmintos (*Ascaris lumbricoides*, *Enterobius spp*) (CDC, 2009).

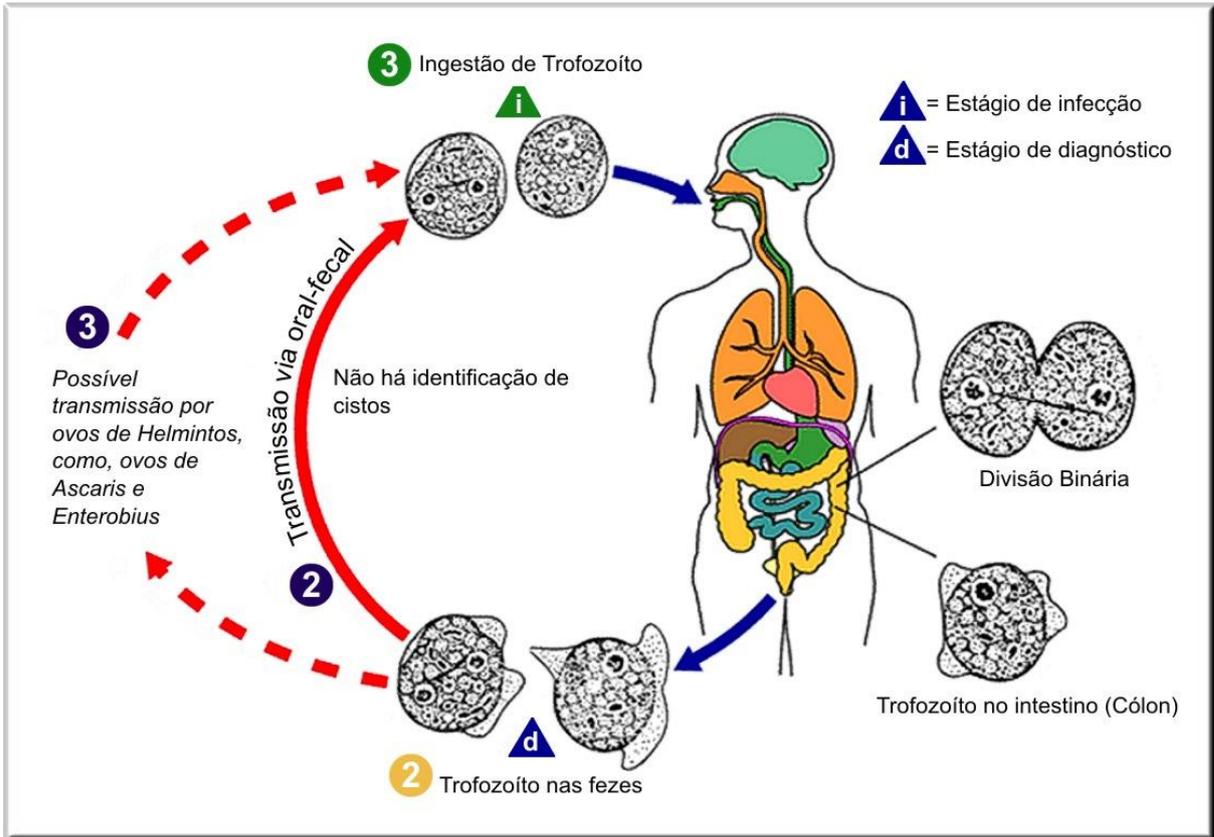


FIGURA 3. Ciclo evolutivo da *Dientamoeba fragilis*.

FONTE: CDC (2009). Acessado em 27/07/200

1.1.4. Variedades moleculares

O gênero ameba apresenta um sério problema, pois revelam poucas características fenotípicas para se fundamentar uma espécie, sendo necessário emprego de marcadores moleculares para identificação das espécies em alguns gêneros de amebas como, por exemplo, a *Entamoeba* (Diamond, Clark, 1993).

Johnson, Clark (2000) identificaram a existência de dois tipos distintos de *Dientamoeba fragilis*, com o emprego da análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição de uma pequena subunidade do RNA-Ribossomal (Ribosomal RNA - rRNA) de *Dientamoeba fragilis*, entre 12 isolados humanos de pacientes sintomáticos e assintomáticos, utilizando as cepas isoladas (Bi/pa) do estudo de Camp et al. (1974).

A revelação de dois genótipos distintos (genótipo 1 e genótipo 2) de *Dientamoeba*, encontrados em apenas dois casos, não representa a espécie como um todo e a divergência na sequência dos genes equivale 2%, aproximadamente. É, portanto, um assunto para debate, pois não existe consenso entre os pesquisadores (Vandenberg et al., 2006). Os diferentes genótipos de *D.fragilis* são referidos pelos autores como 1 e 2.

1.2. Quadro clínico

Segundo Colea et al. (1980), a *Dientamoeba* não é aceita como patógeno por alguns pesquisadores, devido ao fato de ter sido encontrado em pacientes que não tinham sintomas clínicos aparentes ou que apresentavam outros agentes. Estudos epidemiológicos realizados no Canadá, na Inglaterra e na África do Sul mostraram fortes indícios de seu potencial patogênico. Após relato de um estudo na Índia, em que o paciente apresentava ataques intermitentes de diarreia, Håkansson (1936) foi o primeiro a propor que a *Dientamoeba* não era apenas um inocente comensal do nosso organismo. Yoeli (1955) observou um grande número do protozoário *Dientamoeba* em nove pacientes que relatavam dor abdominal intensa, cólicas, náuseas, vômitos, febre e fadiga, com ausência de outros agentes patogênicos.

Numerosos estudos de diversas partes do mundo comprovaram a associação entre a *Dientamoeba* e sintomas, principalmente, dor abdominal, diarreia, náuseas vômitos e fadiga (Wenrich, 1937).

Algumas investigações demonstraram as ligações entre esse parasito e infecção biliar, prurido, colite, colite alérgica, síndrome de intestino irritável e diarreia em pessoas infectadas com o HIV (Stark et al., 2010). Keystone et al. (1984) relataram que a infecção em crianças era mais frequentemente associada com os sintomas clínicos do que com infecções em adultos. As crianças eram, também, expostas a eosinofilia periférica com maior constância (Panosian, 1988; Preiss et al., 1990, 1991).

Em muitos países, médicos e laboratórios de diagnóstico, apesar de o significativo número de estudos que atribuem à *Dientamoeba* a reputação de

legítimo patógeno entérico, raramente a incluem no diagnóstico diferencial e no repertório de patógenos intestinais.

1.3. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

1.3.1. Método para coloração de protozoários

Métodos diretos que utilizam corantes temporários como o Lugol podem ser utilizados como auxiliares na identificação e diferenciação dos parasitos. No entanto apresentam desvantagem quanto à presença de material orgânico, dificultando a visualização das estruturas internas dos parasitos, especialmente dos protozoários, o que exige uma considerável experiência do pesquisador (Estevez, Levine, 1985; Machado et al., 2001). Esses inconvenientes podem ser reduzidos por métodos de coloração e fixação permanentes, garantindo uma definição clara e segura da morfologia dos parasitos (Gardner et al., 1980; De Carli, 2001). Por esses motivos, recomenda-se o uso de esfregaços corados permanentes nos exames parasitológicos de rotina (Jensen et al., 2000; De Carli, 2001).

Dentre as colorações mais comumente empregadas para o estudo dos protozoários intestinais, estão a Hematoxilina Férrica (HF) (Machado et al., 2001; Ferreira, 2003) e o tricômico de Weatley.

1.3.2. Coloração de Hematoxilina Férrica

Segundo Ferreira (2003), a coloração de HF tem sido tradicionalmente recomendada para a pesquisa de protozoários intestinais; é um método clássico que traz excelentes resultados, quando todas as etapas do procedimento forem observadas. Podem ser preparadas em fezes frescas ou conservadas nos fixadores de Schaudin ou PVA. Por suas propriedades

peculiares, a HF tem sido tradicionalmente recomendada para a coloração de protozoários intestinais; é um corante natural, extraído de *Hematoxylon campechianum*, da família *leguminosae*. Antes de seu emprego deve ser “amadurecida”, isto é, transformada, por oxidação em hemateína, que reage com o sulfato férricoamônio para produzir a laca férrica (HF), um corante básico. Habitualmente a HF é usada para corar regressivamente, as lâminas que são primeiramente supercoradas e anteriormente diferenciada (Ferreira, 2003).

Essa técnica tem por finalidade identificar as amebas por meio da coloração de suas estruturas nucleares que têm grande afinidade pelos corantes básicos.

A HF tradicional é considerada excelente, porém trabalhosa, uma vez que é necessário um parasitologista experiente para a execução e obtenção de bons resultados. Porém algumas modificações foram propostas para torná-la mais rápida e prática (Melvin, Brooke, 1982; Ferreira, 2003). A HF simplificada pode ser feita sem perda de qualidade dos resultados, tornando-se aplicável a usos rotineiros. Para isso se reduz o número de passagens e os tempos de permanência das lâminas nos líquidos usados.

A figura 4 mostra em detalhes o procedimento de ambas as técnicas, sendo que a coloração de hematoxilina tradicional é complexa, consome tempo e requer experiência para assegurar que o resultado seja confiável. Essas dificuldades têm sido solucionadas incluindo-se novas modificações, obtendo-se métodos mais curtos e menos complexos, muito dos quais, incorporam o mordente (os íons metálicos de ferro e de alumínio, atuam como mordente) ao corante. (Ferreira e Ávila, 1996)

HEMATOXILINA FÉRRICA TRADICIONAL	HEMATOXILINA FÉRRICA SIMPLIFICADA
A partir do fixador de Shaudinn	A partir do fixador de Shaudinn
Álcool 70% (2 minutos)	Álcool 70% (1 minuto)
Álcool a 95% (1 minuto)	
Lavagem em água corrente (1 minuto)	Lavagem em água corrente (1 minuto)
Mordente (solução de alúmen de ferro 2%) (3 minutos)	Solução lodada (1 minuto) Álcool 70% (1 minuto)
Lavagem em água corrente (1 minuto)	Lavagem em água corrente (1 minuto)
Solução de hematoxilina (5 minutos)	Mordente (solução de alúmen de ferro 2%) (1 minuto)
Lavagem em água corrente (1 minuto)	Álcool 70% (1 minuto)
Diferenciação em alúmen de ferro a 2% - duração variável e relacionada com a aquisição, pelo esfregaço, de transparência adequada, determinada por experiência	Lavagem em água corrente (1 minuto)
Lavagem em água corrente (2 minutos)	
Álcool a 90% (2 minutos)	Solução de hematoxilina (1 minuto)
Álcool a 95% ou absoluto (2 minutos)	Lavagem em água corrente (1 minuto)
Álcool – creosoto (2 minutos)	Se necessário fazer a Diferenciação em alúmen de ferro a 2% - duração variável e relacionada com a aquisição, pelo esfregaço, de transparência adequada, determinada por experiência
Creosoto de faia (2 minutos)	Montagem em bálsamo-do-canadá
Montagem em bálsamo-do-canadá	
24 minutos	9 minutos

Figura 4. Diferenciação das metodologias da HF tradicional (De Carli, 2001) e HF Simplificada (Ferreira,2003)

De acordo com Ferreira (2003), o processo de coloração pela hematoxilina férrica simplificada (HFS) pode ser mais rápido do que os demais, uma vez que as passagens pelos alcoóis e creosotos são supridas.

A utilização de fezes conservadas no fixador é o processo mais recomendável, pois há vantagem do pouco tempo exigido na execução, desde que o pesquisador esteja familiarizado com a técnica.

Utilizando-se o método direto todos os flagelados intestinais podem ser diagnosticados com segurança, quando apresentam motilidade.

Quanto às amebas, suas características morfológicas raramente permitem um diagnóstico seguro em relação ao exame direto. Por esse motivo, é aconselhável utilizar a coloração pela HFS de material fixado logo após a sua coloração. Os elementos corados, além de possibilitarem diagnóstico seguro, são praticamente inalteráveis, permitindo estudos posteriores. No caso de impossibilidade de coleta de material do paciente em local próximo ao laboratório, a coleta poderá ser feita em frasco que contenha fixador e, assim, ser transportada ao local em que serão efetuadas as preparações (Amato Neto, Baldy, 1992).

Estes autores ressaltaram que o diagnóstico de *Dientamoeba fragilis* somente é possível em material corado, uma vez que esse protozoário não forma cistos e seus trofozoítos não apresentam caracteres morfológicos distinguíveis do material não submetido à coloração.

Na coloração de HF utilizada por Burrows e Swerdlow (1965) empregavam-se lamínulas para preparação do esfregaço que não poderiam sofrer secagem durante o processo, sendo as lamínulas colocadas em fixador de Schaudinn (em placas de petri) por 15 minutos para a fixação do esfregaço.

As lamínulas com esfregaço devem passar pelos alcoóis a 50 e 70%, respectivamente, por dois minutos, em seguida, pelo alúmen de ferro por cinco minutos, água corrente por dois minutos, HF 5 a 19 minutos; água novamente por dois minutos e após a diferenciação em alúmen de ferro a 2%, deve-se passar em água corrente por 15 minutos; alcoóis a 80, 90% e absoluto, respectivamente, por dois minutos. Posteriormente a esses processos, passar por creosoto (aquecido) por dois minutos, secar em estufa e examinar no microscópio. (Amato Neto, Baldy, 1992).

1.4. Diagnóstico Imunológico

Atualmente, testes imunológicos específicos para *Dientamoeba fragilis* não estão disponíveis na rotina laboratorial. Chan et al. (1994) foram os

primeiros a desenvolver o método da imunofluorescência indireta (IFI) para identificar o trofozoíto da *Dientamoeba fragilis* em amostras fecais preservadas. O soro anti-*Dientamoeba*, produzido em coelhos, usando a estirpe dixenic *Dientamoeba* bi / pa não apresentou reações cruzadas com nenhuma das quatro espécies de helmintos ou dez espécies de protozoários encontrados em seu estudo. Os autores consideraram a IFI do anticorpo fluorescente indireta altamente específicos para *Dientamoeba fragilis* e foram capazes de identificar o organismo em sete de nove confirmados positivos.

Duas amostras, com apenas um pequeno número de trofozoítos de *Dientamoeba fragilis*, apresentaram resultados questionáveis e, em um estudo posterior, Chan et al. (1994) empregaram uma técnica de *immunoblot* e descobriram que amostras de soro de pacientes com infecções confirmadas para *Dientamoeba fragilis* reagiram com uma proteína de 39-KDa de *Dientamoeba*. Não ficou esclarecido se esta proteína poderia exercer importância na patogênese da doença e se possuía quaisquer propriedades imunoproliféricas.

1.4.1. Diagnóstico Molecular

Poucos estudos, de acordo com a literatura pesquisada, investigaram o potencial de detecção de DNA do parasita em fezes para diagnóstico de infecções por *Dientamoeba fragilis* (Peek et al., 2004).

A utilização de métodos moleculares, na área do diagnóstico de doenças parasitárias, sobretudo dos sistemas que têm como base a amplificação de DNA por meio da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), tem mostrado grande eficácia na confirmação de resultados e na determinação de novas espécies (Amato Neto et al. 2008).

Portanto, segundo estes autores, a técnica da PCR não deve ser aplicada na detecção de DNA da *Dientamoeba fragilis* em fezes. Ademais, no estudo realizado por Peek et al. (2004), a sensibilidade da PCR não obteve, tampouco, resultados satisfatórios em relação a microscopia, considerando-se

que não foram utilizadas diferentes amostras para os dois métodos de detecção.

1.4.2. Cultura

O cultivo de protozoários intestinais não é, geralmente, testado como rotina em laboratórios de diagnóstico (Diamond, 2002; Windsor, Johnson, 1999).

Segundo Robinson e Patricia (1968) o método de cultura pode ser empregado com sucesso, fora de um ambiente de investigação.

A técnica duplicou a taxa de detecção de 1,3 para 2,6%. Os trofozoítos de *Dientamoeba fragilis*, inicialmente, aparecem como arredondados refringentes; após 48h de incubação e aproximadamente dez minutos em temperatura ambiente, começam a produzir pequenos e irregulares pseudópodes, de forma lenta.

Culturas positivas foram obtidas a partir de amostras de fezes armazenadas em temperatura ambiente ou a 4°C por 24 horas.

Sawangjaroen et al. (1993) relataram que a *Dientamoeba fragilis* poderia ser cultivada a partir de fezes armazenadas por até 24 horas em temperatura ambiente, mas a 4°C apenas por dez horas.

O tamanho de *Dientamoeba fragilis* na cultura varia consideravelmente, conforme Silard et al. (1979) que descreveram um intervalo de 6 a 40 µm. Robinson e Patricia (1968) consideraram que essa medida tornou-se uma boa referência para a identificação da *Dientamoeba fragilis* em cultura.

Além disso, o aparecimento de formas circulares marrons avermelhadas preenchidas com amido tem auxiliado esse diagnóstico. Várias amebas intestinais possuem um bom crescimento em meios de cultura utilizados para *Dientamoeba fragilis* e também absorvem amido. Apesar de nenhuma das amebas intestinais demonstrarem as características de motilidade da *Dientamoeba fragilis*, é recomendado que o diagnóstico seja confirmado usando um método de coloração adequado (Robinson e Patricia, 1968).

1.5. TRATAMENTO

Diodohidroquinona, Tetraciclina, Metronidazol e Paramomicina foram anteriormente utilizados para o tratamento da infecção por *Dientamoeba* e a duração desses tratamentos preconizada entre cinco e 21 dias (Turner, 1985; Spencer et al., 1979).

Girginkardesler et al. (2003) utilizaram o secnidazol em dose única e o medicamento mostrou-se eficiente na erradicação da *Dientamoeba*. Os pacientes foram submetidos à dose única, administrada após o jantar para melhorar a biodisponibilidade. Não foram observados efeitos colaterais.

O secnidazol pode ser uma droga inovadora no tratamento da dientamoebíase, administrada em dose única de fácil aplicação e alta eficácia. Essa pesquisa evidenciou, também, o tratamento para *Dientamoeba*, utilizando dose única de secnidazol, sendo 30mg/kg em crianças e 2g para adultos (Girginkardesler et al., 2003).

Norberg et al. (2003), em seu estudo realizado no hospital Universitário, na Suécia, observaram moderado efeito clínico do metronidazol, enquanto Preiss et al. (1991) relataram uma taxa de 70% sucesso em dez dias de tratamento com metronidazol. Quando esse tratamento foi seguido de oxitetraciclina, o índice de sucesso elevou-se para 90%.

Portanto, o tratamento de escolha mais recente é realizado com tetraciclina 500 mg, quatro vezes ao dia, via oral, durante dez dias, sendo ministrada em crianças maiores de oito anos e adultos. Na impossibilidade do uso de tetraciclina, a alternativa é a administração de metronidazol 750 mg, três vezes ao dia, via oral, para adultos ou 30 a 50 mg/kg/dia, em três doses, para crianças, durante dez dias (Gasparini, Portella, 2004).

Cimerman (2009)* afirma que, até o presente momento, não existe menção à nitazoxanida como ação terapêutica, porém como se trata de um protozoário flagelado, existiria a possibilidade terapêutica e, conseqüentemente, um novo fármaco para essa protozoose

* Informação fornecida por Sérgio Cimerman em São Paulo no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, em 2009

1.6. Diarréia e AIDS

A diarreia é uma manifestação clínica comum em pacientes infectados pelo HIV. Acomete em maior número populações de países subdesenvolvidos, mas apresenta-se, também nos países desenvolvidos e, embora exerça algum impacto nos setores de saúde, raramente é fatal (Snyder , Merson, 1982; Gasparini, Portella, 2004).

Na maioria dos casos, independente da região geográfica, a diarreia tem como agentes etiológicos os vírus e as bactérias. No entanto, algumas vezes, os parasitos intestinais, principalmente, os protozoários, também podem causar a manifestação diarreica, nas áreas em que as enteroparasitoses são endêmicas (Farthing, 1997)

Os mecanismos pelos quais os enteropatógenos produzem diarreia são diversos, mas pode-se dividi-los entre os que promovem respostas inflamatórias sem causar dano morfológico e os que alteram a estrutura da mucosa intestinal, com ou sem invasão tecidual (Farthing, 1997)

Durante infecções parasitárias podem ocorrer mudanças na motilidade intestinal, que funcionam como uma resposta patológica, conduzindo à diarreia e, também, como uma resposta adaptativa do intestino, com o propósito de alterar o ambiente do parasito e, assim, contribuir para a expulsão (Castro et al., 1976).

É provável que os parasitos produzam respostas inflamatórias na mucosa intestinal, que podem ser autolimitadas, agudas ou crônicas. A liberação local de mediadores da inflamação, durante a infecção, possivelmente promove a secreção ou inibe a absorção intestinal (Farthing, 1997). Está bem estabelecido que a hipersensibilidade imediata, mediada por IgE, ocorre em reação a alguns enteropatógenos, o que pode contribuir para a instalação da diarréia e, ao mesmo tempo, para a eliminação de parasitos (Baird, O'Malley, 1993; Barrett et al., 1988).

Estudos recentes sugeriram que os distúrbios de motilidade observados em infecções parasitárias não ocorrem apenas pela presença do parasito,

mas resultam do seu processo inflamatório agudo produzido nas células musculares intestinais (Castex et al., 1998).

Tanto a função motora intestinal como a expulsão de parasitos dependem da presença de linfócitos T; a produção de citocinas por linfócitos Th2 predomina nos locais de infecção parasitária e a interleucina 4 é crítica na resposta imune a infecções helmínticas, podendo criar um ambiente desfavorável ao parasito (Svetic et al., 1993; Vallance et al., 1997).

A atividade motora aumentada, aliada à inflamação, seriam os fatores que contribuiriam para a eliminação do parasito intestinal (Nawa et al., 1994).

Portanto é possível que a diarreia ocorra apenas em consequência da tentativa do organismo do hospedeiro expulsar o agente infeccioso, afirma Schanbacher et al. (1978), podendo ser benéfica e partir do processo inflamatório desencadeado pelo próprio parasito, e da atividade motora intestinal acelerada decorrente.

As parasitoses apresentam grande integração com a AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome* - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida). Pesquisas da etiologia das diarreias em AIDS apontam as parasitoses como causa em até 40% dessas manifestações, segundo Lew et al. (1997) *apud* Cimerman (1998).

Define-se classicamente como diarreia episódios de três evacuações pastosas ou aquosas por dia, caracterizando-se ser uma patogenia bastante comum em paciente com AIDS. Pode ser um evento maléfico à medida que o expõe à perda de peso, desnutrição ou desidratação excessiva. Calcula-se que cerca de 50% dos portadores de HIV desenvolvam algum tipo de diarreia durante o curso da doença, associando a diarreia crônica e perda de peso a uma menor sobrevida (Motta, 2002).

As síndromes diabsortivas, associadas ao quadro diarreico, prejudicam a absorção de medicamentos, diminuindo seus níveis séricos terapêuticos e, conseqüentemente, sua eficácia (Motta, Silva 2002).

O envolvimento do intestino no curso da AIDS é de enorme importância, não só pela frequência, mas, principalmente, pela morbidade associada (Rachid, Schechter, 2005).

Os principais agentes etiológicos de diarreia, nesse grupo populacional, são *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Entamoeba histolytica/dispar*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium spp.*, *Clostridium difficile*, *Herpes simplex* e Citomegalovírus e neoplasias (linfoma não-hodgkin, Sarcoma de Kaposi).

Antes de iniciar a investigação diagnóstica, convém lembrar que vários dos medicamentos utilizados por pessoas com AIDS podem levar à diarreia, em especial, os inibidores de protease. A investigação diagnóstica deve incluir exame microscópio de fezes para a pesquisa de sangue oculto, leucócitos e parasitos, além de coprocultura e hemocultura, na existência de febre (Rachid , Schechter, 2005).

Exames de fezes repetidos e tratamentos empíricos devem ser realizados antes da indicação de procedimentos invasivos, como a retossigmoidoscopia e a colonoscopia que, muitas vezes, também não permitem estabelecer o diagnóstico (Rachid, Schechter, 2005).

Descrito pela primeira vez em 1918, por Jepps e Dobell, pouco se sabe sobre o gênero *Dientamoeba*, ou mesmo da espécie *fragilis*, que apresenta distribuição mundial, causando irritabilidade intestinal, associada à colite alérgica e à diarreia em pacientes com AIDS (Gasparini, Portella, 2004; Johnson et al., 2004).

A *Dientamoeba fragilis*, raramente é pesquisada e, em virtude de não haver um consenso na caracterização desse protozoário, apresenta-se somente na forma trofozoítica, que é facilmente destruída pelos métodos de conservação e flutuação, razão pela qual não são empregados (Amato Neto et al., 2008).

A verificação da eventual presença da *Dientamoeba fragilis*, no conjunto de patógenos que causam diarreia em pacientes com AIDS, torna-se imprescindível, inclusive em relação ao seu tratamento. Além disso, a hematoxilina férrica simplificada mostrou-se uma técnica de rápido diagnóstico e eficaz, considerando-se a sua sensibilidade e especificidade ao protozoário.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Este estudo avalia a coloração de Hematoxilina Férrica Simplificada na identificação da *Dientamoeba fragilis*, bem como verifica a prevalência do protozoário associada a causas de diarreia em pacientes com HIV/AIDS.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO

Este estudo foi observacional, prospectivo e de prevalência. Foram coletadas amostras de fezes de 82 pacientes provenientes do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER) que possuíam diagnóstico sorológico positivo para a infecção por HIV e suspeita clínica de diarreia.

Todas as amostras clínicas foram realizadas em esfregaço fecal para a coloração de Hematoxilina Férrica Simplificada, duas lâminas e uma lâmina para as técnicas de sedimentação espontânea (Hoffman et al. 1934), Centrífugo - Sedimentação pela Formalina-Éter (Ritchie, 1948) e coloração de Kynioun (Sodré, Franco, 2001). Dentre os 82 pacientes com dados clínicos para diarreia, um tinha positividade para *Dientamoeba fragilis*.

Os pacientes foram previamente informados de que participariam de um estudo clínico e concordaram mediante termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 3).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (CEP-IIER), sob o Protocolo de Pesquisa nº 58/05 autorizado em 22 de junho de 2006 (ANEXOS 1 e 2).

3.2. LOCAL DO ESTUDO

Este estudo foi realizado no IIER, em suas diversas Unidades de Internação e Ambulatórios, no período de setembro de 2007 a novembro de 2008. Situado em São Paulo/Brasil, esse hospital de Doenças Infecciosas e Parasitárias é também um centro de Referência em atendimento a pacientes com infecção pelo HIV/AIDS.

3.3. COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de fezes foram coletadas pelos próprios pacientes, em frascos com tampa, contendo no seu interior fixador de Schaudinn. Como os componentes do fixador são à base de mercúrio os pacientes foram avisados e orientados sobre a toxicidade do produto (o mercúrio presente no fixador produz vapores tóxicos que podem ser absorvidos pela pele, mucosas, causando intoxicação).

Os frascos foram devidamente etiquetados com nome, data e registro do prontuário do paciente.

As amostras foram colocadas em caixas apropriadas e conduzidas ao laboratório de Parasitologia do IIER.

3.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Constar no quadro clínico do paciente a diarreia, independente do número de evacuações diárias;
- Ter idade maior ou igual a 18 anos;
- Independente do uso ou não de terapia antirretroviral;
- Apresentar soropositividade para HIV por meio de exame de detecção de anticorpos anti-HIV (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay - Elisa*);

3.5. MÉTODOS COPROPARASITOLÓGICOS

Foram empregados os métodos coproparasitológicos para detecção genérica de parasitos (Sedimentação espontânea, Sedimentação por Formalina-Éter e coloração de Kynioun) e um específico para a evidência de *Dientamoeba fragilis*, (coloração de Hematoxilina Férrica Simplificada)

3.5.1 Método de Sedimentação espontânea (Hoffman et al. 1934)

Este método baseia-se na sedimentação espontânea em água e é bastante eficiente para a pesquisa de ovos, larvas de helmintos e cistos de protozoários nas fezes (Hoffman, Pons e Janer et al., 1934).

Colocou-se a amostra em frasco de borel, com aproximadamente 10 mL de água. Misturou-se com um bastão de vidro ou palito de madeira.

Realizou-se a filtração em gaze dobrada quatro vezes, em copo cônico, próprio para a sedimentação (125 mL). Colocou-se em repouso de duas a 24 horas; Colheu-se o sedimento no fundo do cálice com uma pipeta de Pasteur, que é depositado em uma lâmina; adicionou-se uma gota de lugol, cobriu-se com uma lamínula e procedeu-se o exame microscópico em objetiva 100 e 400 vezes.

3.5.2. Centrífugo - Sedimentação pela Formalina-Éter (Ritchie, 1948)

Este é o método mais utilizado para concentrar ovos e cistos, além de elevar a possibilidade de detectar parasitos presentes em pequena quantidade nas fezes (Ritchie, 1948).

Colocou-se 1 ou 2 g de fezes coletadas em frasco contendo 10 mL de água corrente; filtrou-se a suspensão por meio de gaze dobrada quatro vezes, recebendo o filtrado em um tubo cônico de centrífuga de 15 mL; centrifugou-se e decantou-se o sobrenadante, adicionando-se 1 a 2 mL de água corrente ou solução salina a 0,85% ao sedimento. Antes da ressuspensão, completou-

se com água corrente (ou solução salina a 0,85%) 2/3 do volume do tubo, agitou-se e centrifugou-se. Repetiu-se a etapa quatro, até que o sobrenadante se tornasse relativamente claro; depois que o último sobrenadante foi decantado, ressuspendeu-se o sedimento com 1 a 2 mL de formalina a 10% (preferencialmente a solução tamponada de formalina a 10%, pH neutro). Completou-se o volume da suspensão em 10 mL com formalina a 10%; manteve-se em repouso durante cinco minutos; adicionados 3 mL de éter ou acetado de etila, fechou-se o tubo e agitou-se vigorosamente, na posição invertida, por 30 minutos; a tampa foi removida com cautela; centrifugou-se.

Formaram-se quatro camadas: (1) sedimento no fundo do tubo contendo os parasitos; (2) camada de formalina; (3) tampão de detritos fecais; e (4) camada de éter na superfície. Afrouxou-se e separou-se o tampão de detritos das paredes do tubo com um estilete fino e, com cuidado, decantou-se as três camadas superiores; limpam-se as paredes do tubo com *swab* de algodão, removendo os detritos remanescentes; uma pequena quantidade de líquido que permaneceu nas paredes do tubo escorreu para o fundo, junto ao sedimento; o líquido e o sedimento foram misturados e preparadas as lâminas para a pesquisa de ovos, lavas e cistos. O sedimento foi depositado em uma lâmina, adicionou-se uma gota de lugol, cobriu-se com uma lamínula e realizou-se o exame microscópico em objetiva 100 e 400 vezes.

3.5.3. Detecção de *Dientamoeba fragilis*

3.5.3.1. COLORAÇÃO DA HEMATOXILINA FÉRRIDA SIMPLIFICADA

Neste estudo, no procedimento em que se utiliza a técnica de Hematoxilina Férrica Simplificada (HFS) (Ferreira, 2003), foram retiradas as passagens por diferentes tipos de alcoóis, empregando-se apenas o álcool a 70%. A fixação foi realizada a partir de dois esfregaços por amostra para a colocação de HFS, em lâmina e, depois, exposta à secagem em temperatura ambiente para iniciar-se a coloração. O tempo da lâmina nas passagens foi de

um minuto para cada solução. Para os outros métodos da pesquisa foram feitas lâminas de acordo com a rotina do laboratório do hospital. Já para as amostras diarreicas muito líquidas, a diluição foi mínima para a obtenção de maior homogeneidade e, conseqüentemente, melhor esfregaço.

O sedimento, obtido conforme a técnica de (Ritchie, 1948), foi utilizado para a confecção de um esfregaço não muito espesso contendo uma gota do sedimento e uma gota de albumina de Meyer ou soro humano.

Depois de secos em temperatura ambiente foram colocados em fixador de Schaudinn (cloreto de mercúrio mais álcool etílico mais ácido acético), por um minuto (Ferreira,2003 recomenda 5min), após o que foram lavados em água corrente por um minuto. Os esfregaços foram passados em álcool 70% por um minuto; álcool iodado um minuto; álcool 70% e lavados novamente em água corrente por um minuto. A seguir, foram mordentados com alúmen de ferro a 2% a frio por um minuto; lavados em água corrente por um minuto e colocados em solução corante da HFS a 0,5% (preparada com no mínimo 48h de antecedência), por mais um minuto; e, finalmente, lavados novamente em água por mais um minuto.

Posteriormente à verificação da cor do esfregaço, mergulhou-se em água, esperou-se a secagem, adicionou-se uma gota de glicerina e observou-se no microscópico com objetiva de 100 vezes.

Para a vedação de lâmina, passou-se o esfregaço no xilol por duas vezes, por dois minutos cada. Na montagem da lâmina e da lamínula pôde-se utilizar Entellan que, depois da secagem, foram submetidas à microscopia ótica.

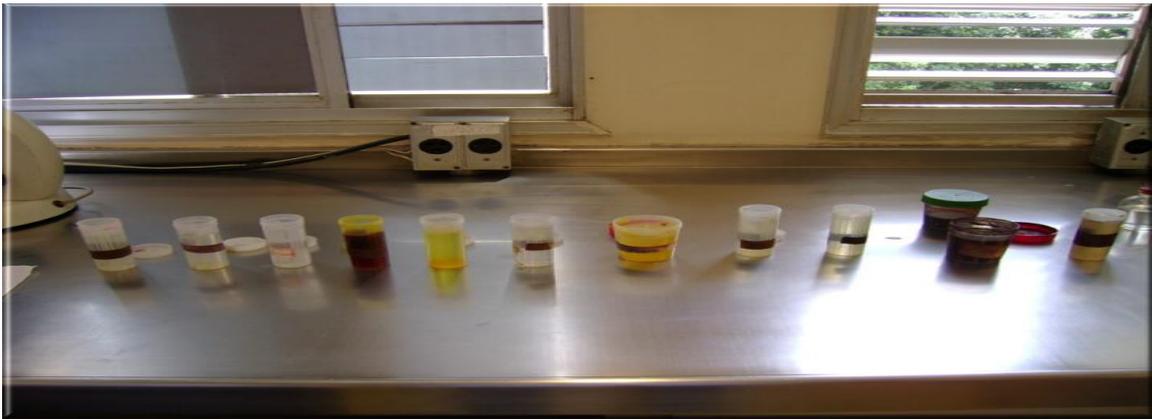


FIGURA 5. Coloração de hematoxilina férrica simplificada

Etapas do procedimento:

Cubeta 01	Fixador de Schaudinn
Cubeta 02	Álcool
Cubeta 03	Água
Cubeta 04	Solução Iodada
Cubeta 05	Álcool
Cubeta 06	Água
Cubeta 07	Alumén de Ferro
Cubeta 08	Álcool
Cubeta 09	Água
Cubeta 10	Hematoxilina
Cubeta 11	Água

Figura 6. Coloração de HFS

3.5.3.2 COLORAÇÃO DE KYNIOUN

A coloração de Kynioun tem sido utilizada na avaliação de coccídeos intestinais de seres humanos como *Isopora belli* e *Cryptosporidium sp* (Sodré, Franco, 2001).

Para cada amostra realizou-se um esfregaço em uma lâmina nova desengordurada, limpa e seca. Após a secagem da lâmina em temperatura ambiente, cobriu-se a totalidade da superfície do esfregaço com solução de fucsina fenicada (Kinyoun), previamente filtrada, sobre as lâminas, no momento da coloração, deixando-a agir por aproximadamente cinco minutos, adicionando mais corante, caso necessário, dentro deste período, evitando-se que a lâmina secasse. Lava-se em água corrente para eliminar a fucsina e em seguida cobriu-se toda a superfície do esfregaço com a solução de álcool-ácido para descorar. Considera-se descorado quando suas partes mais grossas conservassem somente um ligeiro tom rosado. Essa operação durou, em geral, dois minutos; Concluída a fase de descoloração e eliminado o álcool-ácido, lavou-se a lâmina da mesma forma como se procedeu depois da coloração com a fucsina; Cobriu-se toda a superfície do esfregaço com solução de azul de metileno durante 30 segundos a um minuto; Lavou-se, da mesma forma como indicado para a fucsina e em seguida deixou-se secar em temperatura ambiente. Observou-se ao microscópio com objetiva de imersão (100x);

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise descritiva das variáveis foi feita por meio das seguintes medidas-resumo: para variáveis contínuas (idade, carga viral e CD4) foram calculadas média, desvio-padrão, mediana, amplitude (valores mínimo e máximo) e número de pacientes. Para variáveis qualitativas foram apresentadas frequência e porcentagem de ocorrência de cada caso. Foi calculado o intervalo com 95% de confiança para a proporção de casos de *Dientamoeba fragilis* encontrada pelo método HFS. Foram feitos cálculos de tamanho da amostra com o propósito de obter um intervalo de confiança (IC) para a proporção encontrada de parasitos *Dientamoeba fragilis*. Teoricamente, o número de pacientes investigados neste estudo (82), garantiu um intervalo com 90% de confiança em torno da porcentagem de parasitos *Dientamoeba fragilis* detectada pelo método HFS, com precisão de 4%. Os cálculos do IC foram baseados na seguinte fórmula:

$$P\left(\left|\frac{Y}{n} - P_0\right| < d\right) \geq 1 - \alpha$$

Sendo Y/n a proporção de casos encontrados na amostra (supostos 5%), P_0 a proporção na população (desconhecida), d a precisão escolhida, e α o nível de significância, ou o tamanho da amostra. Para a análise descritiva, foi utilizado o software estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 15 para Windows e para o cálculo do tamanho da amostra, o *Number Cruncher Statistical System* (NCSS) 2004 e *Power Analysis and Sample Size* (PASS) 2000 para Windows.

O teste estatístico utilizado foi o teste Qui-Quadrado de Person Odds ($p=0,03$) com IC de 95% para Odds Ratio= [1,13;6,38] para verificar a chance do resultado ser positivo ou negativo das outras técnicas em relação á HFS.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

A análise descritiva dos pacientes, visualizados na tabela 1, mostrou 82 pacientes portadores de HIV/AIDS que participaram deste estudo; na tabela 2, dentre as amostras coletadas a quantidade de 1 amostra para cada indivíduo foi de 64 amostras (78%); de 2 amostras coletadas para cada indivíduo foi de 13 amostras (15,9%); de 3 amostras coletadas para cada indivíduo foi de 5 amostras (6,1%). Sendo a idade média de 37 anos. Destes pacientes, 20 (24,4%) foram do sexo feminino e 62 (75,6%) do sexo masculino, sendo 16 (19,5%) heterossexuais e 12 (14,6%) homossexuais.

Na aquisição do HIV 41 pacientes (50%) contraíram a doença por meio do sexo sem proteção, 12 (14,6%) pelas drogas injetáveis e 5 (6,1%) por transmissão vertical.

Obteve-se na pesquisa de contagem de linfócitos T+CD4, variação de 2 a 1.306 células/mm³, mediana de 51 células/mm³, bem como variação de 49 a 750.000 cópias/ml e mediana de 26.762 cópias/ml, relativamente à carga viral.

Foram relatados 20 sintomas diferentes pelos 82 participantes do estudo. Os sintomas mais citados foram diarreia (95,1%), febre (48,8%) e vômito (47,6%), seguido por tosse (15,9%), fraqueza e perda de peso (11%

Tabela 1. Características demográficas dos 82 pacientes atendidos no IIER

Características demográficas	n=82	(%)
Sexo Masculino	62	75,60%
Feminino	20	24,40%
Idade /Mediana	37	
Carga Viral / Mediana	26762cópias/ml	
CD4 / Mediana	51 células/mm ³	
Relação sexual		
Homossexual	11	
Heterossexual	16	
Aquisição da doença		
Sexo sem proteção	41	50,00%
Drogas	12	14,60%
Transmissão vertical	5	6,10%

Tabela 2. Quantidade de amostras coletadas entre os 82 pacientes do IIER no período de setembro de 2007 a novembro de 2008 para pesquisa de *Dientamoeba fragilis*

Quantidade de amostras	n*	%
1	64	78.0%
2	13	15.9%
3	5	6,1%

Nesta tabela, em 64 indivíduos foi coletada uma amostra (78%); em 13 indivíduos foram coletadas duas amostras (15,9%) e em cinco foram coletadas três amostras.

Dentre os (n*) 82 pacientes, os resultados positivos da HFS em relação a outras técnicas (Sedimentação espontânea, centrifugo sedimentação e Kinyuon) expressos em % foi de 13,4%, gerando uma diferença estatisticamente significativa entre os métodos, quanto ao resultado (Positivo/Negativo). Em média, a chance de o resultado ser positivo com outras técnicas foi de 2,7 vezes maiores a chance de resultado positivo com a HFS, como mostra a tabela 3.

Tabela 3. Diferença entre os resultados (Positivo/ Negativo) entre as técnicas de HSF para pesquisa de *Dientamoeba fragilis*

RESULTADO	HEMATOXILINA FÉRRICA SIMPLIFICADA N (%)	OUTRAS TÉCNICAS N (%)
Negativo	71 (86,6%)	58 (70,07%)
Positivo	11 (13,4%)	24 (29,3%)
TOTAL DE PACIENTES	82 (100,0%)	82 (100,0%)

Foi observada diferença estatisticamente significativa entre os métodos ($p=0,003$) como visualizado na tabela 4. As outras técnicas são capazes de detectar uma quantidade significativamente maior de parasitos, em relação à HFS, conforme mostra na tabela 3, principalmente com relação à *Isospora belli*, *Cryptosporidium sp*, *Schistosoma mansoni* e *Strongyloides stercoralis*, que não foram encontrados por meio da Hematoxicilina. *Endolimax nana* e *Dientamoeba fragilis* foram “mais detectadas” pela Hematoxicilina, sendo que o único parasito não encontrado pelos Outros métodos foi a *Dientamoeba*.

Tabela 4. Ocorrência dos nove parasitos mais frequentes diagnosticados entre os métodos estudados e a frequência de *Dientamoeba* entre os 82 pacientes do estudo.

Parasitos encontrados	Hematoxilina		Outras	
	Férrica		Técnicas	
	Simplificada		np*	(%)
	np*	(%)	np*	(%)
<i>Isoospora belli</i>	0	(0.0%)	9	(11.0%)
<i>Cryptosporidium sp</i>	0	(0.0%)	7	(8.5%)
<i>Entamoeba coli</i>	4	(4.9%)	5	(6.1%)
<i>Giardia lamblia</i>	3	(3.7%)	3	(3.7%)
<i>Schistosoma mansoni</i>	0	(0.0%)	3	(3.7%)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	0	(0.0%)	2	(2.4%)
<i>Blastocystis hominis</i>	1	(1.2%)	1	(1.2%)
<i>Endolimax nana</i>	3	(3.7%)	1	(1.2%)
<i>Dientamoeba fragilis</i>**	1	(1.2%)	0	(0.0%)

**p = 0,003 (Generalização do teste exato de Fisher - Qui-Quadrado para tabelas com frequências esperadas inferiores a cinco unidades)

*número de pacientes (np)=82

Tabela 5. Frequências dos parasitos, considerando o número de ocorrências (total de pacientes) comparando os métodos de Hoffman, Ritchie e Kynion.

Parasitos / Técnicas	Hematoxilina Férrica Simplificada		Hoffman		Ritchie		Kynion	
	np*	(%)	np*	(%)	np*	(%)	np*	(%)
	<i>Blastocystis hominis</i>	1	1,2%	1	1,2%	1	1,2%	1
<i>Dientamoeba fragilis</i>**	1	1,2%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
<i>Endolimax nana</i>	2	2,4%	3	3,7%	3	3,7%	0	0,0%
<i>Entamoeba coli</i>	3	3,7%	3	3,7%	3	3,7%	0	0,0%
<i>Entamoeba coli</i> / <i>E.nana</i>	1	1,2%	1	1,2%	1	1,2%	0	0,0%
<i>Giardia lamblia</i>	0	0,0%	0	0,0%	3	3,7%	0	0,0%
<i>Schistosoma mansoni</i>	0	0,0%	1	1,2%	0	0,0%	0	0,0%
<i>Strongyloides stercoralis</i>	0	0,0%	2	2,4%	2	2,4%	0	0,0%
<i>S.stercoralis</i> / <i>S.mansoni</i>	0	0,0%	3	3,7%	3	3,7%	0	0,0%
<i>Isospora belli</i>	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	6	7,3%
<i>Cryptosporidium</i> sp	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	9	11,0%

** $p < 0,001$ (Generalização do teste exato de Fisher – Qui-Quadrado para tabelas com frequências esperadas inferiores a 5 unidades).

*número de pacientes (np)=82

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A diarreia caracterizada por episódios superiores a três evacuações pastosas ou aquosas por dia é um problema comum no paciente HIV positivo (HIV+) e pode ser um evento desastroso à medida que o expõe à perda de peso, desnutrição ou desidratação excessiva. Calcula-se que cerca de 50% dos portadores de HIV desenvolvam algum tipo de diarreia, durante o curso da doença e vários estudos associam diarreia crônica e perda de peso à menor sobrevida (Motta, Silva 2002).

O trato gastrointestinal desempenha um papel crítico na patogenia da aids, devido a eventos imunológicos na mucosa gastrointestinal que suprimem sua função imunológica e, conseqüentemente, alteram os mecanismos de defesa inespecíficos do intestino (Smith, 1993).

Nos dados provenientes do último boletim epidemiológico de AIDS do Ministério da Saúde do Brasil de 2008, foram identificados 506.499 casos. O padrão de categoria de exposição ao HIV, observado na população estudada, segue a tendência epidemiológica documentada pela casuística de AIDS no Brasil, na qual o Ministério da Saúde aponta o contato sexual como principal forma de transmissão da doença que, no período correspondente entre 1980 e junho de 2008, foi responsável por 78% dos casos identificados em homens e por 71% entre as mulheres (Ministério da Saúde, 2009).

A população pesquisada neste estudo corresponde ao padrão epidemiológico clássico da AIDS, conforme se observa nos dados reportados pelo Ministério da Saúde do Brasil de 2008. A maioria dos pacientes é de adultos jovens, com média de 37 anos de idade, 75,6% pertencem ao gênero masculino e 24,4% ao gênero feminino. A aquisição do HIV, neste estudo, deveu-se à prática sexual sem proteção (46,3%). Estas evidências traduzem a realidade mundial, com grande número de novas infecções adquiridas por via sexual e um substancial aumento de casos em mulheres (Quinn, 1996; Tarantola e Mann, 1996).

As amostras de fezes foram coletadas em frascos contendo conservante (Schaudinn), que possibilitou preservar o material fecal, cujo processo exige no máximo, após a coleta do paciente. Uma vez que os

trofozoítos de *Dientamoeba fragilis* degeneraram rapidamente tornam-se difícil de reconstituir. Por esta razão, as amostras fecais devem ser imediatamente colocadas no fixador (Yang, Scholten, 1977). Dobell, O'Connor (1921) utilizaram o fixador de Schaudinn com a coloração de HFS.

No período de coleta das amostras, uma mudança repentina de diretoria do laboratório colaborador deste estudo permitiu somente a coleta de 105 amostras para 82 pacientes participantes do estudo; mesmo assim, a coloração específica de HFS detectou 1,2% do parasito *Dientamoeba fragilis*. Esse fato pode ter refletido na detecção de um menor número de casos de *Dientamoeba* e, também, segundo relato de Cimerman (1998), em seu estudo na cidade de São Paulo, a infestação por causa dos quadros de amebíase, seja em torno de 1%.

Este estudo adotou o fixador de Schaudinn com o cloreto de mercúrio, de acordo com os estudos de Horen (1981), no qual afirma que o núcleo da *Dientamoeba fragilis* cora-se melhor, assim como a água não foi aquecida durante o preparo do cloreto de mercúrio, conforme recomenda a técnica tradicional para HFS, devido à toxicidade dos vapores de mercúrio. Apenas dissolveu-se bem o cloreto com um bastão de vidro em água, tornando a solução saturada. Verificou-se que a coloração de HFS, realizada por Ferreira (2003), apresentou redução do tempo do processo que consumia apenas cinco minutos, comparando-se à técnica tradicional de HF que era de mais de 30 minutos (Moura et al., 2006).

Garcia (2007) sugere utilizar albumina para aderência do esfregaço fecal na lâmina ao utilizar o fixador de schaudinn. Neste estudo, deixou-se secar o esfregaço em temperatura ambiente e a redução do tempo de permanência da lâmina nos reagentes foi de um minuto para cada lâmina e as passagens dos reagentes e no fixador de Schaudinn, foram também de um minuto, o que não acarretou nenhuma alteração do resultado, tornando-se aplicável aos laboratórios de rotina, sem, contudo, perder a qualidade da coloração.

A técnica apresentou-se muito satisfatória para a detecção da *Dientamoeba fragilis* em pacientes com aids, além de custo mais baixo na aquisição dos reagentes e redução do número de etapas na liberação do resultado, trazendo benefícios aos laboratórios de rotina.

No presente estudo as soluções eram semanalmente substituídas e, como um controle interno da HFS, destilava-se uma gota da HFS próxima a uma gota da solução alúmen de ferro em papel filtro ou em papel toalha, ao surgir um traço negro entre as duas soluções (laca férrica) a coloração mostrava-se em condições de uso.

Recomenda-se que, se no contato com a HFS por um minuto o esfregão tornar-se muito escuro, voltar ao procedimento da solução alúmen de ferro e, posteriormente, ao da água até a obtenção da cor desejada (que deve atingir um cinza-azulado) do esfregão.

Neste estudo não foi observada correlação de significância estatística entre a contagem de células linfocíticas auxiliaadoras T+CD4 e o aparecimento ou ausência de algum parasito especial.

Gasparini, Portella (2004) relataram a coinfeção entre pacientes com enterobíase e *Dientamoeba fragilis*. No presente estudo não foi observada a coinfeção por *Dientamoeba fragilis*, *Enterobius vermicularis* ou a transmissão por ovos de Nematoides, como reportou Healy, 1990; Lagacé-Wiens *et al.*(2006).

Muito embora, tanto este estudo quanto o de Méndez *et al.* (1994), possuam a mesma linha de pesquisa com pacientes HIV/AIDS notam-se algumas divergências. Méndez *et al.* (1994) obtiveram, em 82 pacientes, pelos métodos de Ritchie e Faust, 10,6% do parasito *Dientamoeba fragilis* em dois pacientes.

Neste estudo, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa como mostram as tabelas 6 e 7 entre os métodos Hoffman e Hematoxilina Férrica Simplificada ($p = 0,216$), métodos Ritchie e Hematoxilina Férrica Simplificada ($p = 0,244$), apesar de alguns parasitos (*Giardia lamblia*, *Schistosoma mansoni*, *Strongyloides stercoralis* e *Strongyloides stercoralis/Schistosoma mansoni*) serem mais detectados apenas no método Hoffman. A *Dientamoeba fragilis* foi detectada em 82 pacientes 1,2% pela Hematoxilina Férrica Simplificada e foi o único parasito não detectado pelo método de Hoffman e Ritchie devido ao fato que HFS é uma coloração mais apropriada para a pesquisa de trofozoítos, segundo Garcia (2007).

Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os métodos Kynion e Hematoxilina Férrica Simplificada ($p < 0,001$) visualizado na tabela 8.

A Hematoxilina Férrica Simplificada foi capaz de detectar uma quantidade significativamente maior de parasitas, em relação ao Kynion, sendo este método considerado o “padrão ouro” para a identificação de oocistos (*Cryptosporidium*, *Cyclospora cayetanensis* e *Isopora belli*) reportado por Amato *et al.*(2008). Observa-se, além disso, neste estudo que todos os parasitas encontrados em uma das técnicas são diferentes dos encontrados na outra técnica.

Cimerman (1998), concluiu que as maiores incidências de 27,4% para *Endolimax nana*, 22,6% para *Entamoeba coli*, 21,9% para *Strongyloides stercoralis*, 13% para *Giardia lamblia*, 12,3% para *Isospora belli*, 8,2% para *Ascaris lumbricoides* e 6,8% para *Cryptosporidium sp*, foram detectadas utilizando outros métodos parasitológicos (exame direto, Hoffman, Ritchie, Kato-Katz, coloração Kinyoun) em 200 exames de fezes, em pessoas HIV positivas e negativas. Essas porcentagens são discordantes da atual pesquisa, talvez em função do menor número de pacientes utilizados (82) e da não utilização da HFS para detectar *Dientamoeba*.

Lagacé-Wiens *et al.*(2006) reportaram em seu estudo com 6.363 pacientes, num período de doze meses, com média de 1,74 de amostras por paciente; dentre estas, 150 amostras positivas com *Dientamoeba fragilis*, 100 amostras positivas para *Entamoeba histolytica/díspar*, mas não foi relatada a metodologia empregada e os pacientes não eram portadores de AIDS. Em divergência com o nosso estudo que utilizou a metodologia de Hematoxilina Férrica Simplificada em um total de 82 pacientes e encontrou 1,2% para *Dientamoeba fragilis*.

Girinkardester *et al.* (2003) relataram que, dentre 400 pacientes estudados no Departamento de Parasitologia da Universidade de Cella Bayar (Turquia) foram observados 32 pacientes com quadro de diarreia e dores abdominais associada à *Dientamoeba fragilis*. A coloração de HF foi adotada como obrigatoriedade. Essa discordância, talvez, tenha ocorrido em função do número de pacientes estudados que, neste estudo foi menor.

Lainson, Silva (1999) utilizaram a técnica de Giemsa em 34 pacientes positivos para HIV e detectaram 3% de *Dientamoeba fragilis*, afirmando, porém, sobre a necessidade de uma técnica específica para amebas. Assim sendo, este estudo comprovou que a HFS é o método mais adequado para a

detecção da *Dientamoeba fragilis*, dentre os aplicados na rotina laboratorial, conforme ensinaram Amato, Correia (1991): “Para a comprovação dos tipos de protozoários (...) é útil a coloração pela hematoxilina férrica”.

O paciente positivo para *Dientamoeba fragilis* em nosso estudo mostrou características e sintomas clínicos dentro dos padrões normais em relação a população com AIDS.

Portanto o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a eficácia da coloração de Hematoxilina Férrica Simplificada na identificação da *Dientamoeba fragilis*, bem como verificar a prevalência do protozoário associada a causas de diarreia em pacientes com HIV/AIDS. Entre os diversos artigos científicos analisados, houve divergência em relação à metodologia empregada, divergência entre a população o número de pacientes estudados, uma vez que citam a existência deste parasito por diversas técnicas como relataram Méndez et al. 1994; Lagacé-Wiens et al.(2006); Girginkardester et al (2003).

Explica-se tal situação que, em muitas vezes, os laboratórios desconhecem as técnicas de coloração, ficando o paciente sem um diagnóstico preciso.

Progressos significativos têm sido realizados com intuito de classificar *Dientamoeba fragilis*. Embora, inicialmente, fosse considerada uma ameba, a análise das pequenas subunidades de rRNA mostrou uma relação muito estreita com as Histomonas.

Estudos moleculares recentes poderiam auxiliar na elucidação dessas diferentes observações. Já foram identificados geneticamente dois tipos distintos de *Dientamoeba*, que podem demonstrar diferentes graus de virulência.

A exatidão dos testes diagnósticos para *Dientamoeba* necessita de estudos comprobatórios; assim deveriam ser utilizados outros métodos como as pesquisas moleculares (PCR), imunofluorescência entre outros.

Consequentemente é pouco provável a substituição da coloração permanente em parasitologia para a definição do diagnóstico de *Dientamoeba fragilis*, pois é um método simples rápido, de fácil manejo, como apresentado na descrição da técnica de HFS deste estudo. As desvantagens encontram-se nas variações dos procedimentos do diagnóstico parasitológico de rotina,

utilizados em diferentes laboratórios, que podem ser responsáveis pela disparidade dos resultados.

Infelizmente, ainda existe diferença de opinião sobre o significado clínico desse organismo como um patógeno humano. As provas circunstanciais sugerem que a *Dientamoeba* é patogênica, com base, principalmente, na observação de que há relatos de casos de várias partes do mundo. No entanto não se pode negar que há pacientes que abrigam esse organismo, mas que não exibem seus sinais clínicos.

Existem grandes lacunas no estado atual do conhecimento sobre a virulência, a patogenicidade e o modo de transmissão da *Dientamoeba fragilis*. No entanto já não se justifica a negligência no diagnóstico laboratorial da *Dientamoeba fragilis*, que deveria ser incluída na lista de potenciais responsáveis em casos inexplicáveis de diarreia crônica, dor abdominal, fadiga, flatulência e anorexia, e mesmo em pacientes com síndrome do intestino irritável e em pacientes positivos para HIV com diarreia.

Um estudo comparativo, em pacientes com sorologia positiva para HIV e pacientes com sorologia negativa, entre as técnicas de HFS e PCR para detectar-se a *Dientamoeba fragilis* seria de grande benefício para o tratamento adequado da diarreia ocasionada por esse patógeno.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A coloração de hematoxilina férrica simplificada mostrou-se satisfatória na detecção da *Dientamoeba fragilis*, além de ser uma técnica rápida e prática para diagnóstico em laboratório de rotina, comparando-se com outros métodos de coloração. A *Dientamoeba fragilis* foi associada a uma das causas de diarreia em HIV/AIDS em nosso grupo populacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amato Neto V, Correa LLC. Exame Parasitológico das fezes. 5ª ed. São Paulo: Sarvier.1991; p.92.

Amato Neto V, Baldy JLS. Doenças Transmissíveis. 3ªed. São Paulo: Atheneu; 1992.

Amato Neto V, Amato VS, Tuon FF, Gryscek RCB. Parasitologia – Uma Abordagem Clínica. 1ª ed. São Paulo: Elsevier; 2008. p.456.

Baird AW, O'Malley KE. Epithelial ion transport-possible contribution to parasite expulsion. Parasitol Today 1993; 9: 141-3.

Barrett KE, Neva FA, Gam AA, Cicmanec J, London WT, Phillips JM, Metcalfe DD. The immune response to nematode parasites: modulation of mast cell numbers and function during *Strongyloides stercoralis* infections in non-human primates. Am J Trop Med Hyg 1988; 38: 574-81.

Camp RR, Mattern CF, Honigberg BM. Study of *Dientamoeba fragilis* Jepps & Dobell. I. Electronmicroscopic observations of the binucleate stages. II. Taxonomic position and revision of the genus. J Protozool. 1974; Feb 21(1):69-82.

Castex N, Fioramonti J, Lahitte JD, Luffau G, More J, Bueno L. Brain fos expression and intestinal motor alterations during nematode-induced inflammation in the rat. Am J Physiol 1998; 274: G210-6.

Castro GA, Badial-Aceves F, Smith JW, Dudrick SJ, Weisbrodt. Altered small bowel propulsion associated with parasitism. *Gastroenterology* 1976; 71: 620-5.

Centers for Diseases Control - CDC. DPDx-Lab Assistance. *Dientamoeba fragilis*. Life Cycle. 2009 [Acesso em 22 jul 2009]. Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/html/Dientamoeba.htm>.

Chan MS, Medley GE, Jamison DE, Burdy DAP. The evaluation of potencial global morbidity attributable to intestinal nematode infections. *Parasitology* 1994; 9:373-387.

Chatton EPL. *Pansporella perplexa*, amoebien a spores protegees, parasite des daphnies. Reflexions sur la biologie et la phylogenie des protozoaires. *Ann Sc. Nat Zool.* 1925; 10e Ser. 8:5-85.

Cimerman, S. Prevalência de Parasitoses Intestinais em Pacientes Portadores de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1998.

Cimerman S.; Castañeda GC, Juliano, AW; Palacios R. Perfil das Enteroparasitoses Diagnosticadas em Pacientes com Infecção pelo vírus HIV na era da terapia antiretroviral potente em um Centro de Referência em São Paulo, Brasil. *Parasitol Latinoam.* 2002; 57(3-4):111-119.

Colea A, Silard R, Panaitescu D, Florescu P, Roman N, Capraru T. Studies on *Dientamoeba fragilis* in Romania. II. incidence of *Dientamoeba fragilis* in healthy persons. *Arch Roum Pathol Exp Microbiol.* 1980; Jan-Mar 39(1):49-53.

De Carli GA. Parasitologia clinica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para diagnósticos das parasitoses humanas. São Paulo: Atheneu, 2001.

Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. J Eukaryot Microbiol. 1993; May-Jun 40(3):340-4.

Dobell C. Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. X. The life-history of *Dientamoeba fragilis*: observations, experiments, and speculations. Parasitology. 1940; 32:417-461.

Dobell C, O'Connor FW. The intestinal protozoa of man. 1st. London: John Bale and Daniellsson; 1921.

Dwyer DM. Analysis of the antigenic relationships among *Trichomonas*, *Histomonas*, *Dientamoeba*, and *Entamoeba*. I. Quantitative fluorescent antibody methods. J Protozool. 1972a; May 19(2):316-25.

Dwyer DM. Analysis of the antigenic relationships among *Trichomonas*, *Histomonas*, *Dientamoeba*, and *Entamoeba*. II. Gel diffusion methods. J Protozool. 1972b; May 19(2):326-32.

Dwyer DM. Analysis of the antigenic relationships among *Trichomonas*, *Histomonas*, *Dientamoeba* and *Entamoeba*. 3. Immunoelectrophoresis technics. J Protozool. 1974; Feb 21(1):139-45.

Estevez EG, Levine JA. Examination of preserved stool specimens for parasites: lack of value of the direct wet mount. J Clin Microbiol. 1985; 22(4):666-7.

Ferreira CS, Amato Neto V, Alarcón RSR, Gakiya E. Identification of *Cryptosporidium* ssp oocystis in fecal smears stained with Heidenhain's iron hematoxylin. Rev. Inst. Med. Trop. S.Paulo 2001; 43:431- 432.

Ferreira CS. Coloração de protozoários intestinais pela hematoxilina férrica de Heidenhain. Rev Inst Med Trop. 2003; Jan-Feb 45(1):43-4.

Ferreira W, Ávila S. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Autoimunes. 1ª ed. São Paulo: Guanabara-Koogan; 1996. p.139.

Garcia LS, Shimizu YR. Evolution of Intestinal Protozoan Morphology in Human Fecal Specimens Preserved in EcoFix: Comparison of Wheatley's Trichrome Stain and EcoStain. Journal of Clinical Microbiology 1998; 36:1974-1976.

Garcia, L.S. In Diagnostic Medical Parasitology, ASM Press(editora) 5ª ed – 2007.p.47-49.

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. 1980; Nov 12(5):656-8.

Gasparini EA, Portella R. Particularidade das Infecções por Protozoários. In: Manual de Parasitoses Intestinais. 1ª ed. Rio de Janeiro: Rubio; 2004. p. 117.

Girginkardesler N, Coskun S, Cüneyt Balçioğlu I, Ertan P, Ok UZ. *Dientamoeba fragilis*, a neglected cause of diarrhea, successfully treated with secnidazole. Clin Microbiol Infect. 2003; Feb 9(2):110-3.

Grassé PP. Famille des Dientamoebidae. In: Grasse PP. Traité de zoologie. Paris, France: Masson et Cie; 1953. p. 50-54.

Håkansson EG. *Dientamoeba fragilis*, a Cause of Illness. Am J Trop Med 1936; s1, 16(2):175-185.

Healy, G.R. Giardiasis in perspective : the evidence of animals as a source of human Giardia infections. In E.A. Meyer (ed.), Giardiasis Human Parasitic Diseases, vol.3.p.305-313.Elsevier Biomedical Press, New York.1990

Hoffmann WA, Pons JA, Janer JL. Sedimentation concentration method in schistosomiasis, Puerto Rico. J. Public Health 1934; 9: 283-298.

Horen WP. Modification of Schaudinn fixative. J Clin Microbiol 1981; Jan 13(1):204-5.

Jensen B, Kepley W, Guarner J, Anderson K, Anderson D, Clairmont J, De L'aune W, Austin EH, Austin GE. Comparison of polyvinyl alcohol fixative with three less hazardous fixatives for detection and identification of intestinal parasites. J Clin Microbiol 2000; Apr 38(4):1592-8.

Jepps MW, Dobell C. *Dientamoeba fragilis*, ng, nsp, a new intestinal amoeba from man. Parasitology 1918; 10:352–367.

Johnson EH, Windsor JJ, Clark CG. Emerging from obscurity: biological, clinical, and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*. Clin Microbiol Rev 2004; Jul 17(3):553-70.

Johnson JA, Clark CG. Cryptic genetic diversity in *Dientamoeba fragilis*. J Clin Microbiol 2000; Dec 38(12):4653-4.

Katz DE, Taylor DN. Parasitic infections of gastrointestinal tract. Gastroenterol.Clin.North Am 2001; 30:797-815.

Keystone JS, Yang J, Grisdale D, Harrington M, Pillon L, Andreychuk R. Intestinal parasites in metropolitan Toronto day-care centres. *Can Med Assoc J.* 1984; Oct 131(7):733-5.

Laison R, Da Silva, BA. Intestinal parasites of some diarrheic HIV seropositive individuals in North Brazil with particular reference to *Isopora belli* Wenyon, 1923 and *Dientamoeba fragilis* Jepps & Dobell, 1918. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1999; 94:611-613.

Lagacé-Wiens, R.P.; VanCaeseele, G.P.; Koschik, C. *Dientamoeba fragilis*: an emerging role in intestinal disease. Department of Medical Microbiology and Infections Diseases, University of Manitoba; Cadham Provincial Laboratory, Winnipeg, Man. *Can. Med. Assoc. J.*, September 26, 2006; 175(7): 777 - 777

Machado RL, Figueredo MC, Frade AF, Kudó ME, Silva Filho MG, Pova MM. Comparação de quatro métodos laboratoriais para diagnóstico da *Giardia lamblia* em fezes de crianças residentes em Belém. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; Jan-Fev 34(1):91-3.

Melvin DM, Brooke MM. Laboratory procedures for the diagnosis of intestinal parasites. US HHS Publication CDC, 1982 n.82.8282.

Méndez OC, Szmulewicz G, Menghi C, Torres S, González G, Gatta C. Comparison of intestinal parasite infestation indexes among HIV positive and negative populations [Article in Spanish]. *Medicina (B Aires)* 1994; 54(4):307-10.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - Programa Nacional de DST e Aids. Boletim Epidemiológico, Ano V, nº 1, julho a dezembro de 2007 - janeiro a junho de 2008. [Acesso em 20 mar 2009]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/documents/storedDocuments/%7BB8EF5DAF-23AE-4891-AD36-1903553A3174%7D/%7B31A56BC6-307D-4C88-922D6F52338D0BF4%7D/Boletim2008_vers%E3o1_6.pdf>.

Motta MEFA, Silva GAP. Diarréia por parasitos. Rev Bras Saúde Matern Infant 2002; Mai-Ago 2(2):117-27.

Moura RA, Wada SC, Purchio A, Almeida VT. Técnica de Laboratório. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2006.

Nawa YN, Ishikawa K, Tsuchiya Y, Horii T, Abe AI, Khan BB, et AL. Selective effector mechanisms for the expulsion of intestinal helminths. Parasite Immunology 1994; 16:333–338.

Neto VA, Gryscek RCB, Amato VS, Tuon F, organizadores. Parasitologia uma abordagem clínica. 1ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008, v.1. p. 220-223.

Norberg A, Nord CE, Evengård B. *Dientamoeba fragilis*--a protozoal infection which may cause severe bowel distress. Clin Microbiol Infect 2003; Jan 9(1):65-8.

Panosian CB. Parasitic diarrhea. Infect Dis Clin North Am. 1988; Sep 2(3):685-703.

Peek R, Reedecker FR, van Gool T. Direct amplification and genotyping of *Dientamoeba fragilis* from human stool specimens. J Clin Microbiol 2004; 42(2):631-5.

Pessoa SB. Amebas Não Patogênicas. Amebas de Vida Livre. Causas de Erro em Exames de Fezes. In: Pessoa SB. Parasitologia Médica. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan; 1958. p.140

Preiss U, Ockert G, Broemme S, Otto A. *Dientamoeba fragilis* infection, a cause of gastrointestinal symptoms in childhood. Klin.Paediatr 1990; 202:120-123.

Preiss U, Ockert G, Broemme S, Otto A. On the clinical importance of *Dientamoeba fragilis* infections in childhood. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol 1991; 35(1):27-34.

Quinn TC. Global burden of the HIV pandemic. Lancet. 1996; Jul 348(9020):99-106.

Rachid M, Schechter M. Afecções do Trato Digestivo. In: Manual HIV/AIDS. 8ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2005. p.82.

Riedel OO, Noronha MCC, Sampaio EM, Moreira TF, Maia MJC, Barbosa CS. Enteroparasitos detectados em amostras de fezes provindas de pacientes de Hospital Universidade em Fortaleza, Ceará, Brasil: I - protozoários amebianos. Rev Med Univ Fed 1986-7; 26/27(1/2):29-33.

Ritchie LS. An ether sedimentation technique for routine stool examination. Bulletin of the United States Army Medical Department. 1948;(8):326.

Robinson GL. The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. TransR Soc Trop Med Hyg. 1968a; 62(2):285-94.

Robinson GL, Ng PH. The size of *Dientamoeba fragilis* in culture. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1968b; 62(1):156-8.

Sawangjaroen N, Luke R, Prociv P. Diagnosis by faecal culture of *Dientamoeba fragilis* infections in Australian patients with diarrhea. Trans R Soc Trop Med Hyg 1993; Mar-Apr 87(2):163-5.

Schanbacher LM, Nations JK, Weisbrodt NW, Castro GA. Intestinal myoelectric activity in parasitized dogs. Am J Physiol 1978; 234: 188-95.

Silard R, Colea A, Panaitescu D, Florescu P, Roman N. Studies on *Dientamoeba fragilis* in Romênia. I. *Dientamoeba fragilis* isolated from clinical cases. Problems of diagnosis, incidence, clinical aspects. Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol 1979; 38:359-372.

Smith PD. Diarréia infecciosa nos pacientes com AIDS. Clin Gastroenterol Am Norte 1993; 3:369-84.

Snyder JD, Merson MH. The magnitude of the global problem of acute diarrheal disease: a review of active surveillance data. Bull World Health Organ. 1982; 60(4):605-13.

Sodré FC, Franco RM. Novos aspectos sobre um tema bem conhecido: *Cryptosporidium*. Rev. Brasileira de Analises Clinicas 2001; 33(2):97- 106.

Spencer MJ, Garcia LS, Chapin MR. *Dientamoeba fragilis*. An intestinal pathogen in children? Am J Dis Child 1979; Apr 133(4):390-3.

Stark D, Barratt J, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis J. A Review of the Clinical Presentation of *Dientamoebiasis*. Am J Trop Med Hyg. 2010; 82: 614-619.

Svetic A, Madden KB, Zhou XD, Lu P, Katona IM, Finkelman FD, et al. A primary intestinal helminthic infection rapidly induces a gut-associated elevation of Th2-associated cytokines and IL-3. *J. Immunol* 1993; 150: 3434-41.

Svetic A, Madden KB, Zhou XD, Lu P, Katona IM, Finkelman FD, et al. A primary intestinal helminthic infection rapidly induces a gut-associated elevation of Th2-associated cytokines and IL-3. *J Immunol.* 1993; 150(8 Pt 1):3434-41.

Turner JA. Giardiasis and infections with *Dientamoeba fragilis*. *Pediatr Clin North Am* 1985; 32:865-81.

Vallance B, Blennerhassett P, Collins S. Increased intestinal muscle contractility and worm expulsion in nematode-infected mice. *Am J Physiol* 1997; 272: G321-7.

Vandenberg O, Peek R, Souayah H, Dediste A, Buset M, et al. Clinical and microbiological features of dientamoebiasis in patients suspected of suffering from a parasitic gastrointestinal illness: a comparison of *Dientamoeba fragilis* and *Giardia lamblia* infections. *Int J Infect Dis* 2006; May 10(3):255-61.

Wenrich DH. Studies on *Dientamoeba fragilis* (protozoa). II. Report of unusual morphology in one case with suggestions as to pathogenicity. *J Parasitol.* 1937; 23:183-96.

Windsor JJ, Rafay AM. Laboratory detection of *Dientamoeba fragilis*. *Br J Biomed Sci.* 1997; Sep 54(3):223-4.

Windsor JJ, Johnson EH. *Dientamoeba fragilis*: the unflagellated human flagellate. *Br J Biomed Sci* 1999; 56(4):293-306.

Yang J, Scholten T. *Dientamoeba fragilis*: a review with notes on its epidemiology, pathogenicity, mode of transmission and diagnosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1977; 26:16-22.

Yoeli M. A report on intestinal disorders accompanied by large numbers of *Dientamoeba fragilis*. J Trop Med Hyg. 1955; Feb 58(2):38-41.

ANEXO I.

PROTOCOLO DE PESQUISA Nº 58/05



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DOS SERVIÇOS DE SAÚDE
INSTITUTO DE INFECTOLOGIA "EMILIO RIBAS"
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Av. Dr. Arnaldo, 155 - Cerqueira César - São Paulo - SP
CEP: 01246-900 - TEL: 3896-1406

0014
[Handwritten signature]

PARECER

PROTOCOLO DE PESQUISA N.º 58/C/5	Data da entrada:
PARECER N.º 046/2006	Sessão: 22/02/2006

Título da Pesquisa: "Infecção por Dientamoeba fragilis em doentes com AIDS"

Investigador Principal: Wilma Assunção Juliano

CONSIDERAÇÕES: O Comitê de Ética em Pesquisa considera respondidas as pendências do parecer anterior e aprova o estudo.

(X) APROVADO
() APROVADO COM RECOMENDAÇÕES
() REPROVADO
() COM PENDÊNCIAS- OBS.: a ausência de resposta em 60 dias, acarretará em arquivamento do processo por falta de interesse do pesquisador.

TEMÁTICA ESPECIAL SIM NÃO
CONEP SIM NÃO
SVS (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA) SIM NÃO

Pe. João Inácio Mildner
Pe. João Inácio Mildner
Comitê de Ética em Pesquisas - I.I.E.R

ANEXO II.
FOLHA DE APROVAÇÃO DO
PROTOCOLO DE PESQUISA Nº 58/05



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE SERVIÇOS DE SAÚDE
INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMÍLIO RIBAS
DIRETORIA DE DIVISÃO CIENTÍFICA
SERVIÇO DE ENSINO E PESQUISA

DIVISÃO CIENTÍFICA

PROTOCOLO DE PESQUISA Nº 58/05

TÍTULO: "INFECÇÃO POR DIENTAMOEBIA FRAGILIS EM DOENTES COM AIDS"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL NO IIER: WILMA ASSUNÇÃO IULIANO

AUTORA PRINCIPAL: JULIANA ALVES GARCIA

ORIENTADOR: SÉRGIO CIMERMAN

AUTORIZAÇÃO PARA INÍCIO DO ESTUDO

Devidamente aprovado pela Comissão Científica, Comitê de Ética em Pesquisa, Diretoria Técnica de Departamento deste Instituto e regular quanto às informações sobre financiamento do projeto, o protocolo de pesquisa acima está **AUTORIZADO** para ter início.

Registre-se. Comunique-se.

São Paulo, 22 de junho de 2006.

Prof. Dra. Luiza Helena F. R. Carvalho
Chefe da Seção de Pesquisas e Trabalhos Científicos

ANEXO III.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



0012
[Handwritten signature]

Instituto de Infectologia Emílio Ribas
Comitê de Ética em Pesquisa

Av. Dr. Arnaldo, 165 CEP 01246900/ telefone: (11) 3896-1406

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pessoas que têm aids podem sofrer de diarreia. A causa nem sempre fica conhecida e isso impede tratamento adequado. É possível que estejam influenciando causas ainda não lembradas. Por isso, julgamos necessário verificar se a *Dientamoeba fragilis*, parasita geralmente esquecido, pode ser uma dessas causas. Desejamos, então, realizar exame das fezes por meio de coleta e pesquisa apropriadas deste parasita. É um procedimento totalmente sem perigo para você. Se houver necessidade, conforme resultado obtido, o tratamento será administrado pelo seu médico.

Nome paciente:.....

Assinatura paciente:

Eu,.....me responsabilizo por.....

Data:.....

Assinatura do Responsável..... Data:

.....
Prof. Dr. Sérgio Cimerman
Assinatura Orientador
(contato:8377-7272)

.....
Wilma Assunção Juliano
Assinatura Pesquisador IIER
(contato ramal IIER 1427)

.....
Juliana Alves Garcia
Assinatura Pesquisador
(contato 7373-9321)

.....
Dr. Wladimir Queiroz
Coordenador do Comitê de Ética do IIER
(contato: 3896-1406)

ANEXO IV.
SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA A TÉCNICA DE
HEMATOXILINA SIMPLIFICADA

**Soluções utilizadas para a Técnica de Hematoxilina Simplificada
(Ferreira, 2003)**

A	Solução de Schaudinn
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Biclreto de Mercúrio (solução saturada) ▪ Álcool absoluto ▪ Álcool acético glacial 	<p>200ml</p> <p>100ml</p> <p>15ml a cada 100ml da mistura</p>

Obs.: Cloreto de mercúrio solubilidade em água 6,5g/100ml a 20°C ou 48g/100ml a 100°C.

B	Solução Iodado
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Álcool a 70% ▪ Tintura de iodo a 2% 	<p>98ml</p> <p>2ml</p>
<p>Obs: Dissolve-se 2g de iodo em 100ml de álcool acrescentando alguns cristais de iodeto de potássio (cerca de 2g).</p>	

C	Solução de Alúmen de Ferro
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alúmen de ferro (ou sulfato férrico amônio) ▪ Água destilada 	<p>2g</p> <p>98ml</p>
<p>Obs.: Guardar em frasco âmbar.</p>	