



FACULDADE PERNAMBUCANA DE SAÚDE
Programa de Pós-Graduação *Lato Sensu* em Diagnóstico
Molecular

ANÉSIA BEZERRA DA FONSÊCA

RAFAEL VITAL DOS SANTOS

ANÁLISE *IN SILICO* DOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A DETECÇÃO DA
***ENTAMOEBIA HISTOLYTICA*.**

Recife

2015

ANÉSIA BEZERRA DA FONSÊCA

RAFAEL VITAL DOS SANTOS

**ANÁLISE *IN SILICO* DOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A DETECÇÃO DA
Entamoeba histolytica.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação *Lato Sensu* em Diagnóstico Molecular da Faculdade Pernambucana de Saúde, para a obtenção do Título de Especialista em Diagnóstico Molecular.

Orientador(a): Prof(a). MSc. *Ana Kelly Silva Lins*

Recife

2015

RESUMO

SANTOS, R.V.. DA FONSECA, A.B. ANÁLISE *IN SILICO* DOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A DETECÇÃO DA *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA*. Trabalho de conclusão de curso. Faculdade Pernambucana de Saúde, Recife, Pernambuco, Brasil.

A Organização Mundial de Saúde em 1997, determinou que devem ser adotado procedimentos que permitam a diferenciação da *E. histolytica* de outras espécies, sendo o tratamento da amebíase administrado somente nos casos confirmados da presença do parasito. Técnicas de biologia molecular como a reação em cadeia da polimerase (PCR), podem ser comumente empregadas no diagnóstico específico da infecção apresentando-se como uma ferramenta poderosa na determinação do perfil epidemiológico da amebíase. Após a consolidação da Bioinformática nos anos 90, inúmeros trabalhos vêm recorrendo a simulação virtual (análise *in silico*), visando melhor reprodutibilidade na bancada. O objetivo do presente trabalho é detectar os iniciadores com melhor desempenho no diagnóstico da amebíase descrito na literatura utilizando a bioinformática e verificar a ocorrência de alinhamento dos iniciadores com o genoma do parasito e/ou contigs depositados em banco de dados genéticos. Foram selecionados trabalhos publicados na literatura que usam a PCR para detecção da *E. histolytica* no período 2001-2014. Para análise da especificidade dos iniciadores foram utilizados os indicadores de cada alinhamento através do BLASTn: score, valor E, identidade máxima e a cobertura do sense e antisense de cada iniciador. O alinhamento das sequências de cada iniciador contra o GenBank (NCBI) foi validado através do programa generunner v.3.05. No total de 35 trabalhos publicados, 20 iniciadores foram analisados. Destes, 11 iniciadores alinharam satisfatoriamente com genômicas e/ou contigs apresentando resultados relevantes nos indicadores de qualidade do alinhamento, sendo validados com potencial reprodutivo e 9 apresentaram problemas significantes como alinhamento com sequências de outras espécies (inespecíficos), ausência total de alinhamento, amplicon com variações bem acima (até 110pb) do tamanho indicada pelo autor do trabalho e erro na publicação pelo acréscimo ou ausência de pares de bases. Os resultados da análise *in silico* indicam a importância da utilização de procedimentos da bioinformática para a seleção adequada de iniciadores publicados na literatura no desenvolvimento da técnica de PCR no diagnóstico da amebíase.

Palavras-chave: *Entamoeba histolytica*, análise *in silico*, PCR

ABSTRACT

SANTOS, R.V.. DA FONSECA, A.B. ANALYSIS IN SILICO OF THE PRIMERS USED FOR THE DETECTION OF ENTAMOEBA HISTOLYTICA. 2015. Trabalho de conclusão de curso. Faculdade Pernambucana de Saúde, Recife, Pernambuco, Brasil.

The World Health Organization in 1997, established procedures that must be adopted to allow the differentiation of *E. histolytica* from other species, and the treatment of amoebiasis administered only in cases that the presence of the parasite is confirmed. Molecular biology techniques such as polymerase chain reaction (PCR) can be commonly used in the specific diagnosis of infection presenting as a powerful tool to determine the epidemiological profile of amebiasis. After the consolidation of Bioinformatics in 90 years, numerous studies have been using virtual simulation (in silico analysis), to better reproducibility on the bench. The objective of this study is to detect the primers with better performance in the diagnosis of amebiasis described in the literature using bioinformatics to check the alignment of occurrence of the primers with the genome of the parasite and / or contigs deposited in genetic database. Papers published in the literature were selected using PCR to detect *E. histolytica* in the period 2001-2014. To analyze the specificity of the primers were used indicators of each alignment through BLASTn: score, E value, maximum identity and coverage of sense and antisense of each primer. The alignment of each primer sequences against GenBank (NCBI) was validated by generunner software v.3.05. A total of 35 published works, 20 primers were analyzed. Of these, 11 primers satisfactorily aligned with genomic and / or contigs with relevant results in alignment of quality indicators, and validated with reproductive potential and 9 showed significant problems such as alignment with sequences from other species (non-specific), total lack of alignment with amplicon well above variations (up 110pb) size indicated by the author of the work and error in the publication by the addition or absence of base pairs. The results of in silico analysis indicates the importance of using bioinformatics procedures for the proper selection of primers published in the literature in the development of PCR in the diagnosis of amebiasis.

Keywords: *Entamoeba histolytica*, in silico analysis, PCR

SUMÁRIO

1.	<u>INTRODUÇÃO</u>	06
2.	<u>OBJETIVOS</u>	08
	2.1 Geral	08
	2.2 Específico	08
3.	<u>MÉTODOS</u>	09
	3.1 ANÁLISE IN SILICO DOS INICIADORES DESCRITOS NA LITERATURA PARA DETECÇÃO DA <i>E. histolytica</i> E <i>E. díspar</i>	09
	3.2 EXTRAÇÃO DO DNA	10
	3.3 AMPLIFICAÇÃO	12
	3.4. DETECÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO	12
4.	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	13
5.	<u>CONCLUSÃO</u>	17
6.	<u>REFERÊNCIAS</u>	18

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde em 1997, determinou que devem ser adotado procedimentos que permitam a diferenciação da *E. histolytica* de outras espécies, sendo o tratamento da amebíase administrado somente nos casos confirmados da presença do parasito (OMS/OPAS,1997). No grupo das parasitoses causadas por protozoários, a amebíase constitui a segunda maior causa de mortalidade, superada apenas pela malária. Estima-se que 500 milhões de pessoas são infectadas pela *E. histolytica* anualmente. Destas, 40 milhões desenvolvem a forma sintomática da doença, resultando em cerca de 100.000 óbitos por ano devido a complicações secundárias (WHO, 1997).

No Brasil, a situação epidemiológica da amebíase permanece indefinida em várias regiões, mas os poucos dados existentes demonstram grande variação na prevalência da infecção a depender da localidade. Em Recife-PE nenhum caso foi encontrado, contrastando dados encontrados na região metropolitana Belém-PA, cuja prevalência chega a 29,35%, caracterizando a amebíase como problema de saúde pública (PINHEIRO, 2004; SILVA, 2005). Em Maceió-AL, estudos indicam uma prevalência da parasitose igual a 1% na população de escolares (DUARTE, 2006).

A observação de dados epidemiológicos com relação à forma sintomática e assintomática da parasitose fez Brumpt, em 1925, sugerir a existência de outra espécie de *Entamoeba* - *E. dispar* (Brumpt, 1925) - morfologicamente indistinguível da *E. histolytica*. Desta forma, a *E. dispar* se comportaria como um comensal do intestino humano, sendo responsável pelos casos assintomáticos, e a *E. histolytica* representaria a espécie causadora da forma patogênica da infecção (DIAMOND & CLARK, 1993).

A distinção das duas espécies foi demonstrada por estudos imunológicos, genéticos e bioquímicos, confirmando a hipótese de Brumpt, sendo referendada pela OMS em 1997. Até então os dados epidemiológicos relativos à amebíase eram obtidos através do diagnóstico microscópico pela observação das formas de cistos e trofozoítos do parasito, que não permite a diferenciação da *E. histolytica* de outros amebídeos comensais do intestino humano (DIAMOND & CLARK 1993; TANYUKSEL & PETRI, 2003; OMS/OPAS/UNESCO, 1997).

Atualmente, a presença da *E. histolytica* deve ser confirmada por técnicas de diagnóstico específicas como imunodiagnóstico pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), para detecção de antígenos; ou técnicas de biologia molecular como a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do DNA, uma vez que o tratamento é preconizado somente nos casos confirmados de amebíase (WHO, 1997). Com o advento de parte do genoma (49%) da *E. histolytica* em 2005, tornou-se mais fidedigna a pesquisa de regiões genômicas espécie-específica necessárias para utilização de técnicas de biologia molecular no diagnóstico (LOFTUS et al., 2005).

Após a consolidação da bioinformática nos anos 90, inúmeros trabalhos vêm recorrendo a simulação virtual (análise *in silico*), visando melhor reprodutibilidade na bancada. Neste racional, o objetivo do presente trabalho foi detectar os iniciadores com melhor desempenho no diagnóstico da amebíase através da análise por bioinformática dos iniciadores descritos na literatura.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Detectar os iniciadores com melhor desempenho no diagnóstico da amebíase através de ferramentas computacionais dos iniciadores descritos na literatura.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Realizar o levantamento bibliográfico dos artigos científicos publicados que utilizaram e descreviam os iniciadores da técnica de PCR aplicados a detecção de *E. histolytica*

2.2.2 Aplicar técnicas de bioinformática

2.2.3. Avaliar *in vitro* a performance do iniciador com melhor desempenho na análise *in silico*.

3. MÉTODOS

3.1 ANÁLISE IN SILICO DOS INICIADORES DESCRITOS NA LITERATURA PARA DETECÇÃO DA *E. histolytica* E *E. dispar*

Foram selecionados os iniciadores descritos na literatura com melhor desempenho para o diagnóstico da amebíase. Foram selecionados trabalhos publicados que usaram a PCR para detecção da *E. histolytica*/*E. dispar*.

Para análise da especificidade dos iniciadores foram utilizados indicadores de cada alinhamento através do BLASTn (**Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide**), tais como: escore, valor E, identidade máxima e a cobertura do sense e antisense de cada iniciador. O alinhamento das sequências de cada iniciador contra o GenBank (**National Center for Biotechnology Information - NCBI**) foi validado com o auxílio do programa GeneRunner v.3.05 de domínio público.

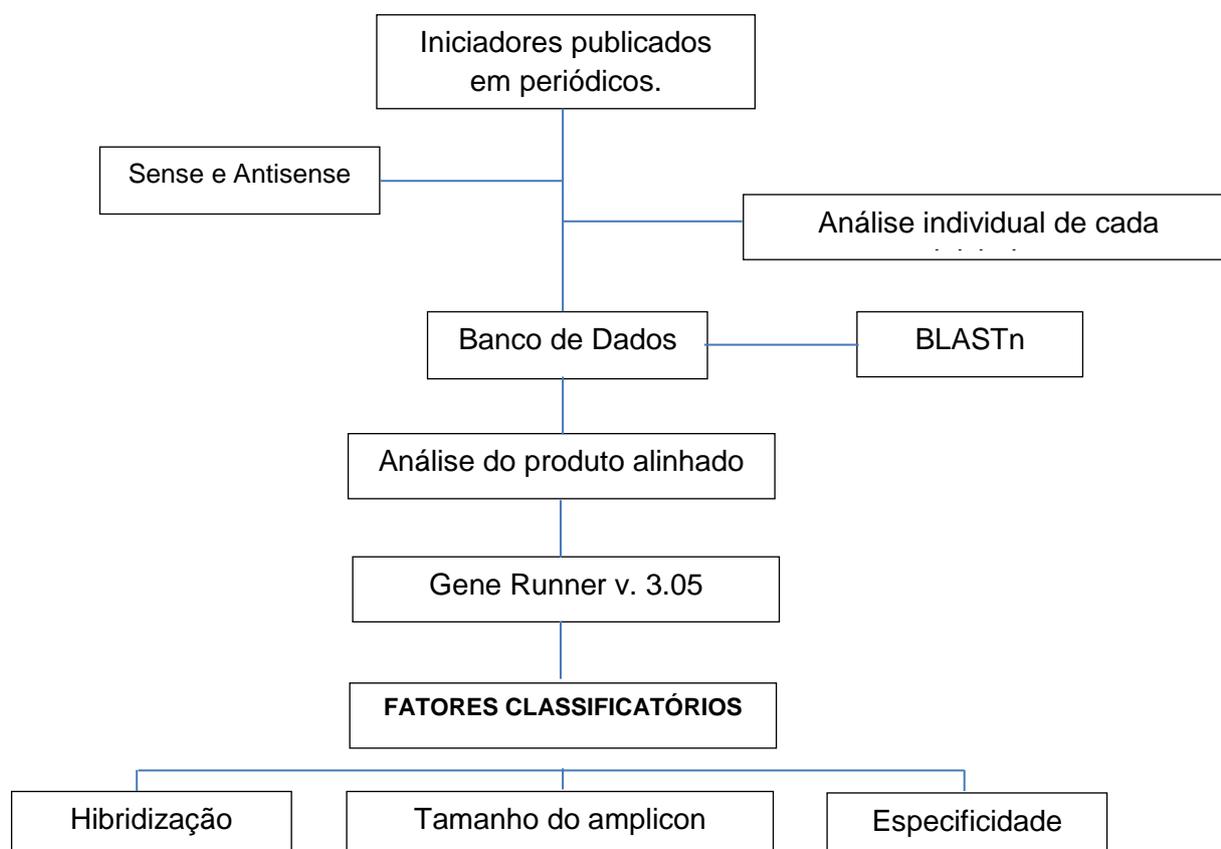


Figura 1: Diagrama da análise virtual dos iniciadores descritos na literatura para a detecção da *E. histolytica* e *E. dispar*.

3.2 EXTRAÇÃO DO DNA

A depender do material a ser processado (fezes ou cultura) foi necessário adaptar o método de extração do DNA. Nas fezes o parasito pode estar presente em pequena quantidade, e é encontrado em geral na forma de cistos, que são mais resistentes ao rompimento para liberação do material genômico, e estão misturados a inibidores que limitam a atividade enzimática da DNA polimerase. Estes fatores devem ser levados em consideração, pois podem interferir no desempenho da técnica. Em cultura há menor probabilidade da interferência de inibidores, há maior quantidade do DNA-alvo e a forma evolutiva encontrada é o trofozoíto, o que facilita o processo de lise celular para liberação do DNA genômico.

A extração do DNA dos controles positivos (cultura) foi realizada de acordo com Sambrook e colaboradores (1987), com algumas modificações, conforme descrito a seguir:

- 1) Foram adicionados 10 μ L da cultura em 500 μ L de tampão de extração (1%);
- 2) Em seguida, foram acrescentados 5 μ L proteinase K (QIAamp®), sendo o material incubado por 10 minutos a 70°C em bloco térmico (FINEPCR® Thermo Bath ALB64);
- 3) Acrescentou-se no mesmo tubo igual volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). O material foi homogeneizado durante 3 minutos por agitação manual, seguido de centrifugação por 3 minutos a 12.000 rpm;
- 4) Removeu-se o sobrenadante para um novo tubo e repetindo-se a etapa 3;
- 5) O sobrenadante foi depositado em uma coluna de concentração de DNA Microcon (YM-100, Millipore®) e centrifugado a 8.000 rpm durante 10 minutos;
- 6) Descartou-se o material filtrado sendo adicionada à membrana 200 μ L de água ultra-pura. Centrifugou-se o material a 8.000 rpm durante 10 minutos. Este procedimento era repetido por mais uma vez;

- 7) O DNA preso na coluna de concentração foi ressuspendido em 50 μ L de TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 7,4). A coluna foi invertida em um novo tubo e o material centrifugado a 12.000 rpm durante 3 minutos;
- 8) O DNA extraído foi acondicionado a -20°C para posterior análise pela PCR.

A extração do DNA das amostras de fezes foi realizada utilizando o *Kit Spin Stool DNA PSP* (Invitex®), de acordo com instruções do fabricante, como descrito a seguir:

- 1) Transferiu-se 200-400mg de fezes para um microtubo de 2 mL;
- 2) Adicionou-se 1.200 μ L de *Lysis buffer P* agitando-se no vórtex continuamente durante 1 minuto;
- 3) O material foi então incubado durante 10 minutos a 95°C em bloco térmico, em seguida no gelo durante 1 minuto, e novamente a 95°C em bloco térmico durante 5 minutos;
- 4) O material foi centrifugado durante 6 minutos a 12.000 rpm;
- 5) Após transferência de todo o sobrenadante para o *Invi-Adsorb-Tube*, agitou-se o material em vórtex continuamente durante 15 segundos, incubando a suspensão durante 1 minuto em temperatura ambiente;
- 6) Foi repetida a etapa 4;
- 7) O sobrenadante foi transferido para um microtubo novo de 1,5ml. O precipitado foi descartado, e a etapa 4 repetida;
- 8) Foi adicionado 25 μ L de proteinase K em um novo microtubo de 1,5ml. Em seguida 400 μ L do sobrenadante da etapa 7 foi adicionado. Toda amostra foi agitada e incubada durante 10 minutos a 70°C em bloco térmico;
- 9) Adicionou-se 400 μ L de *Binding Buffer P* ao lisado e agitou-se no vórtex continuamente durante 15 segundos. Em seguida toda amostra foi transferida para *Spin filter*, sendo incubado durante 1 minuto a temperatura ambiente;

- 10) O material foi centrifugado durante 3 minutos a 12.000 rpm e o filtrado descartado;
- 11) Foi adicionado 500 μ L de *Wash Buffer I* no *Spin Filter*, e repetida a etapa 11;
- 12) Foi adicionado 800 μ L de *Wash Buffer II* no *Spin Filter*, e repetida a etapa 11;
- 13) Para remoção do etanol foi repetida a etapa 4.
- 14) O *Spin filter* foi colocado em um novo microtubo de 1,5ml, foram adicionados 200 μ L de *Elution Buffer D* (70°C). A amostra foi centrifugada a 8000 rpm durante 1 minuto para eluição do DNA.
- 15) O DNA extraído foi acondicionado a -20°C para posterior análise pela PCR.

3.3 AMPLIFICAÇÃO

A reação em cadeia da polimerase foi realizada de acordo com Rivera e colaboradores (1996) com as seguintes modificações: o volume final foi reduzido de 50 μ L para 25 μ L, diminuindo a quantidade de reagente e conseqüentemente o custo, e a concentração de soro albumina bovina (BSA) foi reduzida de 500ng para 400ng como preconizado por Kreader (1996).

A reação de amplificação foi composta de 20mM Tris-HCl, 50mM KCl, 200 μ M de dNTP, 1,5mM de MgCl₂, 20pM de cada iniciador (p11plus/ p12plus e p13plus/p14plus), 2U de *Taq* Polimerase Platinum (Invitrogen®), 400ng de BSA, 2 μ L de DNA e H₂O ultra-pura q.s.p. 25 μ L. A programação do termociclador (PCR Express Thermo Hybaid®, UK) consistiu em 35 ciclos de 94°C por 1minuto (desnaturação), 59°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 1minuto (extensão).

3.4 DETECÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO

Após a amplificação, 10 μ L de cada produto da PCR foi aplicado em gel de Agarose 2% a 100V durante uma hora, revelado com brometo de etídio (10 mg/mL), visualizado sob luz ultravioleta (Vilber Lourmat® TFX-20.M, Alemanha) e fotodocumentado (Vilber Lourmat DP-001 FDC, Alemanha). A análise dos resultados foi realizada com auxílio do programa de computação (PhotoCaptMw version 10.01 for Windows).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A bioinformática tem como ferramentas essenciais programas de computadores e os bancos de dados disponíveis na internet, atividade fundamental para a análise de sequências de DNA e proteínas, sendo capaz de oferecer aumento de velocidade na análise de sequências de DNAs de diferentes fontes, na comparação de variabilidades e na previsão de resultados de análises *in vitro* (Machado et al., 2013).

A análise *in silico* para orientar a busca de iniciadores, facilita o trabalho do pesquisador, uma vez que, é mais rápido e econômico que a análise laboratorial, e utiliza para sua execução programas de computador de acesso gratuito na Internet. Foram analisados 56 trabalhos publicados no período de 1991-2014, sendo avaliados por bioinformática 20 iniciadores desenvolvidos para pesquisa do DNA de *Entamoeba*, principalmente para o diagnóstico específico da *E. histolytica* e *E. díspar*.

Vários iniciadores apresentaram desempenho insatisfatório na análise através da bioinformática como: (a) alinhamento com sequências de outras espécies com formação virtual do amplicon; (b) ausência de alinhamento dos iniciadores com o genoma da espécie alvo; (c) distinção por polimorfismo (RFLP) inexistente entre o padrão da *E. histolytica* e outras espécies; (d) amplicon com número de bases acima ou abaixo do informado pelos autores (Tabela 01).

Tabela 01 – Discriminação do resultado da análise dos 20 iniciadores analisados por bioinformática.

Revisão da literatura *	Status dos iniciadores		Total
	Válido	Inválido	
PCR CONVENCIONAL	5	5	10
PCR NESTED	3	1	4
PCR REAL TIME	2	1	3
PCR MULTIPLEX	-	1	1
PCR RFLP	1	1	2
Total**	11 (55%)	9 (45%)	20 (100%)

* - 57 artigos publicados no período de 1991- 2014. ** - ($p > 0,05$)

Baseado na análise *in silico*, os iniciadores selecionados para a detecção da infecção causada pela *E. histolytica* e *E. dispar* foram o p11plus/p12plus e p13plus/p14plus, respectivamente. Os dois conjuntos de iniciadores foram desenvolvidos para amplificar regiões distintas para cada espécie, codificantes de uma proteína antigênica de 30 KDa rica em serina (Tabela 02). Para avaliar a especificidade dos iniciadores selecionados na análise *in silico* foram avaliadas amostras de fezes positivas pela microscopia para outros parasitos como *Ascaris lumbricoides*, *Trichures trichiura*, *Ancylostomatidae*, *Strongyloides stercoralis*, *Enterobius vermicularis*, *Schistosoma mansoni*, *Hymenolepis nana*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba coli* e *Endolimax nana*. Não houve amplificação do DNA em nenhuma dessas amostras, tanto frente a iniciadores desenhados para *E. histolytica* (p11plus/p12plus) como para *E. dispar* (p13plus/p14plus) (Figura 01). Esses resultados corroboram com os achados por Haghghi e Cols., 2002; Jiang e Cols., 2008; Myjak e Cols., 2000; Pinheiro e Cols., 2004.

A especificidade foi igualmente testada para verificar se os iniciadores desenhados para *E. histolytica* amplificavam fragmentos gênicos da *E. dispar* e vice-versa. Ambos os iniciadores foram espécie específicos não havendo formação de amplicons em nenhuma das situações (Figura 02). Este achado corrobora com os resultados da análise virtual dos iniciadores.

No presente estudo não foi realizado o teste de sensibilidade para determinação da quantidade mínima DNA extraído de cistos de *Entamoeba* detectado pela PCR. Os resultados de Rivera e colaboradores (1996) sugerem uma boa sensibilidade da PCR, com a detecção de no mínimo cinco cistos com os iniciadores p11plus/p12plus e p13plus/p14plus. A reprodutibilidade foi avaliada durante os experimentos da padronização, realizados sempre em triplicata, não existindo nenhuma discordância nos resultados.

Tabela 02 – Iniciador com excelente desempenho na análise *in silico* e na prática laboratorial.

Iniciadores*	Sequência	Referencia
^a p11plus	☞XM_001914604.1 ☞XM_001914570.1	Haghighi <i>et al.</i> , 2002
^a p12plus	☞XM_647979.2 ☞XM_644379.2	Jiang <i>et al.</i> , 2008
Produto = 100pb	☞EU022309.1 ☞X70996.1 ☞D10512.1 ☞D00871.1 ☞M35635.1	Myjak <i>et al.</i> , 2000 Pinheiro <i>et al.</i> , 2004
^b p13plus	☉XM_001740812.1 ☉XM_001738989.1	Rivera <i>et al.</i> , 1996, 1998 e 2006.
^b p14plus	☉XM_001738704.1 ☉XM_001738370.1 ☉XM_001738351.1 ☉XM_001737932.1 ☉XM_001737799.1 ☉D00872.1	Sanuki <i>et al.</i> , 1997
Produto = 101pb	☉AB026184.1 ☉XM_001737278.1 ☉XM_001737174.1 ☉XM_001737144.1 ☉XM_001736359.1 ☉XM_001736301.1 ☉XM_001735152.1 ☉XM_001734937.1 ☉XM_001734803.1 ☉XM_001734803.1 ☉XM_001734803.1 ☉XM_001733877.1 ☉XM_001733539.1	Tachibana <i>et al.</i> , 1991, 1992, 2000 e 2001 Zaman <i>et al.</i> , 2000 Zengzhu <i>et al.</i> , 1999 Zindrou <i>et al.</i> , 2001

* - Região codificante de proteína 30-kDa antigênica

a - Iniciador específico para o diagnóstico da *E. histolytica*.

b - Iniciador específico para o diagnóstico da *E. dispar*

☉ - Sequência genômica depositada no Genbank da *E. dispar*.

☞ - Sequência genômica depositada no Genbank da *E. histolytica*.

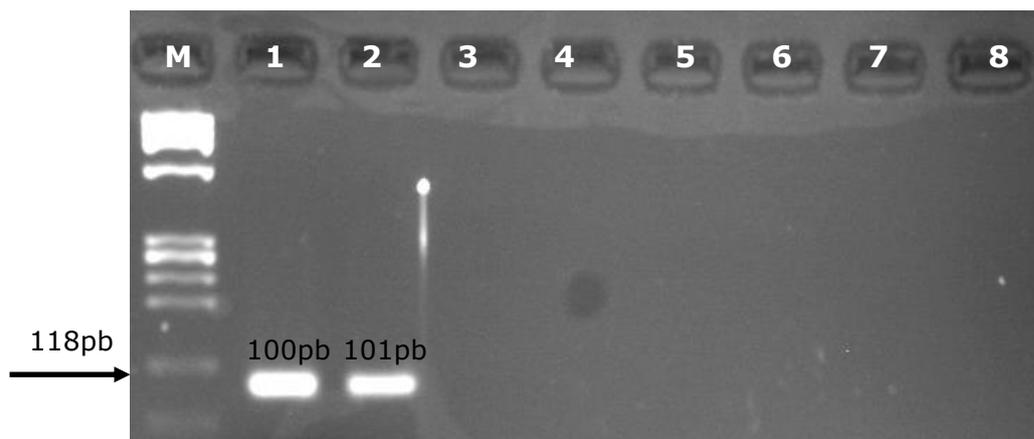


Figura 01 – Gel de Agarose 3%. Poço M: Marcador de peso molecular ϕ X 174 RF (Promega®); Poços 1 e 2: Controle positivo *E. histolytica* (100pb) e *E. dispar* (101pb), respectivamente; Poços 3 à 7 amostras de fezes positivas para diferentes espécies de parasitos; Poço 3: *Ascaris lumbricoides*, *Trichures trichiura*; Poço 4: Ancylostomatidae, *Strongyloides stercoralis*; Poço 5: *Enterobius vermicularis*, *Schistosoma mansoni* Poço 6: *Hymenolepis nana*, *Giardia lamblia* ; Poço 7: *Entamoeba coli* e *Endolimax*; Poço 8: Controle negativo para ambas as espécies.

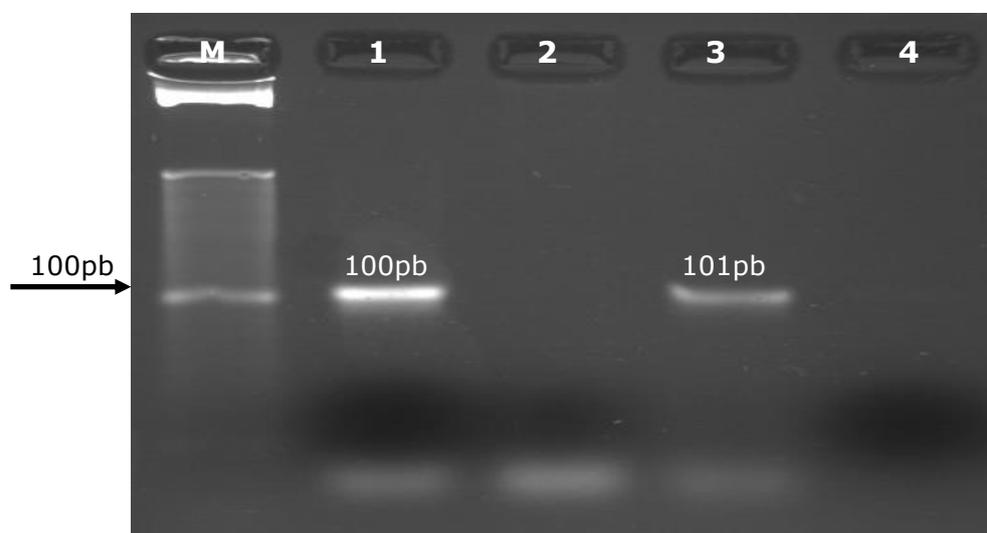


Figura 02 – Gel de Agarose 3%. Poço M: Marcador de peso molecular de 20pb (Invitrogen®); Poços 1 e 3: Controle positivo da *E. histolytica* (100pb) e *E. dispar* (101pb), respectivamente; Poço 2: amostra com DNA da *E. dispar* amplificado com iniciadores para *E. histolytica*; Poço 4: amostra com DNA da *E. histolytica* amplificado com iniciadores para *E. dispar*.

5. CONCLUSÃO

Os resultados da análise *in silico* indicam a importância da utilização de técnicas de bioinformática para a seleção adequada de iniciadores publicados na literatura para o diagnóstico molecular da amebíase.

6. REFERÊNCIAS

DIAMOND L.S.; CLARK C.G. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *Journal Eukaryot Microbiology*, v. 40, p. 340–400, 1993.

DUARTE, I.A.C. Prevalência da *Entamoeba histolytica* em alunos de escolas públicas da cidade de Maceió. 2006. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco-Recife, 2006.

HAGHIGHI, A.; KOBAYASHI, S.; TAKEUCHI, T.; MASUDA, G.; NOZAKI T. Remarkable genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a limited geographic area. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p.4081–4090, 2002.

KREADER, C.A. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n.03, p.1102–1106, 1996.

JIANG, B.; YANG, G.Y.; YU, X.M.; CHENG, A.C.; BI, F.J. A case report: *Entamoeba histolytica* infections in the rhesus macaque, China. *Parasitology Research*, v. 103, p. 915–917, 2008.

LOFTUS, B.; ANDERSON, I.; DAVIES, R.; ALSMARK, U. C.; SAMUELSON, J.; AMEDEO, P.; RONCAGLIA, P.; BERRIMAN, M.; HIRT, R.P.; MANN, B.J.; NOZAKI, T.; SUH, B.; POP, M.; DUCHENE, M.; ACKERS, J.; TANNICH, E.; LEIPPE, M.; HOFER, M.; BRUCHHAUS, I.; WILLHOEFT, U.; BHATTACHARYA, A.; CHILLINGWORTH, T.; CHURCHER, C.; HANCE, Z.; HARRIS, B.; HARRIS, D.; JAGELS, K.; MOULE, S.; MUNGALL, K.; ORMOND, D.; SQUARES, R.; WHITEHEAD, S.; QUAIL, M.A.; RABBINOWITSCH, E.; NORBERTCZAK, H.; PRICE, C.; WANG, Z.; GUILLEN, N.; GILCHRIST, C.; STROUP, S.E.; BHATTACHARYA, S.; LOHIA, A.; FOSTER, P.G.; SICHERITZ-PONTEN, T.; WEBER, C.; SINGH, U.; MUKHERJEE, C.; EL-SAYED, N.M.; PETRI, W.A.Jr.; CLARK, C.G.; EMBLEY, T.M.; BARRELL, B.; FRASER, C.M.; HALL, N. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*, v. 433, p. 865–868, 2005.

MACHADO, E. L.; SILVA, S. A.. Desenho e validação de iniciadores microssatélites SSR para mamoneira. *Pesq. Agropec. Bras*, v.48, n.11, pp. 1457-1463. . 2013

MYJAK, P.; KUR, J.; PIETKIEWICZ, H. Usefulness of new DNA extraction procedure for PCR technique in species identification of *Entamoeba* isolates. *Wiadomości Parazytologiczne*, v. 43, p. 163–170, 1997.

OMS/OPAS/UNESCO – Organización Mundial de la Salud/Organizacion Panamerica de la Salud/Organizacion de las Naciones Unidas para la Educacion, la Ciencia y la Cultura. Consulta con expertos en amibiasis, Ciudad de Mexico, v. 18, p. 13–14, 1997.

PINHEIRO, S.M.B.; CARNEIRO, R.M.; ACA, I.S.; IRMAO J.I.; MORAIS Jr, M.A.; COIMBRA, M.R.M.; CARVALHO Jr, L.B. Determination of the prevalence of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in the Pernambuco State of Northeastern Brazil by a polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 70, n. 02, p. 221–224, 2004.

SANUKI, J.; ASAI, T.; OKUZAWA, E.; KOBAYASHI, S.; TAKEUCHI, T. Identification of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* cysts in stool by polymerase chain reaction. *Parasitology Research* v. 83, p.96–98, 1997.

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

RIVERA, W.L.; TACHIBANA, H.; SILVA-TAHAT, M.R.A.; KANBARA, H.U.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. *Parasitology Research*, v. 82, p. 585–589, 1996.

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

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, Usa, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1987.

SANUKI, J.; ASAI, T.; OKUZAWA, E.; KOBAYASHI, S.; TAKEUCHI, T. Identification of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* cysts in stool by polymerase chain reaction. *Parasitology Research* v. 83, p.96–98, 1997.

SILVA, M.C.M.; MONTEIRO, C.S.P.; ARAÚJO, B.A.V.; SILVA, J.V.; POVOA, M.M. Determinação da infecção por *Entamoeba histolytica* em residentes da área metropolitana de Belém, Pará, Brasil, utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígenos. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 21, n. 03, p. 969–973, 2005.

TACHIBANA, H.; CHENG, X. J.; KOBAYASHI, S.; MATSUBAYASHI, N.; GOTOH, S.; MATSUBAYASHI, K. High prevalence of infection with *Entamoeba dispar*, but not *E. histolytica*, in captive macaques. *Parasitology Research*, v. 87, p.14–17, 2001.

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

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

TACHIBANA, H.; KOBAYASHI, S.; TAKEKOSHI, M.; IHARA, S. Distinguishing pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* by polymerase chain reaction. [The Journal of Infectious Diseases](#), v.164, p.825–826, 1991.

TANYUKSEL, M.; PETRI, W.A.Jr. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16 p. 713–729, 2003.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Amoebiasis. *Weekly Epidemiologic Record*. v. 72, p. 97–100, 1997.

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

ZENGZHU, G.; BRACHA, R.; NUCHAMOWITZ, Y.; CHENG. W.; MIRELMAN, D. Analysis by Enzyme–Linked Immunosorbent Assay and PCR of human liver abscess aspirates from patients in China for *Entamoeba histolytica*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p.3034–3036, 1999.

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