

## ProSpect® Microplate Assays

**ProSpect® Microplate Assays REMEL** aumentam a produtividade das retinas laboratoriais, permitindo testes simultâneos de 5 diferentes antígenos (entéricos, toxinas e vírus) com relevantes benefícios:

- Reagentes comuns para todos os kits
- Resultados em menos de duas horas
- ELISA com poucos passos
- Incubação em temperatura ambiente
- Alta sensibilidade e especificidade
- Leitura visual de fácil interpretação
- Anticorpos monoclonais: maior sensibilidade e especificidade
- Resultados não dependem de microrganismos viáveis
- Uso de pequenos volumes de amostras
- Confiança e qualidade OXOID / REMEL

**ProSpect®** maximiza a eficiência operacional, onde um técnico pode testar simultaneamente vários antígenos de uma mesma amostra.

**ProSpect®** permite o uso de reagentes comuns entre os 5 kits disponíveis.

**ProSpect®** permite resultados no mesmo dia, envolvendo apenas 5 minutos de manipulação.

Kits disponíveis:

<b>ProSpect®</b> <i>C. difficile</i> Toxina A/B (96 testes)	R244596
<b>ProSpect®</b> Giardia (96 testes)	R2458096
<b>ProSpect®</b> <i>Entamoeba histolytica</i> (96 testes)	<b>R2456096</b>
<b>ProSpect®</b> Cryptosporidium (96 testes)	R2454096
<b>ProSpect®</b> Rotavirus (96 testes)	R24920967

**INSTRUÇÕES DE USO**  
**PROSPECT ENTAMOEBA HISTOLYTICA KIT (CÓD. 2456048 – 48 testes/ CÓD.2456096 – 96 testes)**

Ensaio ImunoEnzimático para detecção de antígeno *Entamoeba histolytica* em Microplaca

**INTRODUÇÃO**

O diagnóstico da amebíase é feito tradicionalmente pelo Exame Parasitológico de Fezes (EPF) em amostras fecais ou de tecido. A microscopia é complicada, devido à natureza frágil dos trofozoítos e à liberação intermitente das formas vivas. Já foi demonstrado que mesmo com 6 a 9 EPFs, chegou-se a um diagnóstico de apenas 72-76% das vezes (4). Em um estudo observou-se que a probabilidade de diagnóstico com base em um EPF foi de apenas 50%, nos casos em que 100.000 cistos eram excretados diariamente e de 0,45%, nos casos em que 1000 cistos/dia eram excretados (3). Problemas significativos causados por diagnóstico errado de *E. histolytica* já foram documentados. Resultados falso negativos acontecem quando técnicos inexperientes não detectam o parasita e resultados falso positivos acontecem quando leucócitos, outras amebas, células sanguíneas ou detritos são identificados erroneamente como *E. histolytica* (2). Na amebíase extraintestinal é possível que os organismos não sejam excretados nas fezes e que os testes sorológicos se façam necessários para o diagnóstico. No entanto, problemas com testes sorológicos ocorrem quando os títulos de anticorpos são baixos ou difíceis de interpretar. Em áreas endêmicas, uma alta prevalência de soro positividade dificulta o diagnóstico da infecção. Portadores assintomáticos de cistos podem ter resultados sorológicos negativos (1). A persistência dos anticorpos durante períodos prolongados após a infecção dificulta a distinção entre infecção atual ou superada.

A multiplicação da *E. histolytica* no trato intestinal resulta na produção de antígenos específicos (EHSA) que estão presentes nas fezes de pessoas infectadas. Os EHSA podem ser detectados com uma única amostra de fezes, comparado com as múltiplas amostras de fezes necessárias para o EPF. A detecção dos EHSA elimina os problemas comuns de diagnóstico, como a identificação errônea e problema na identificação correta de organismos e de títulos de anticorpos persistentes ou ausentes.

**PROSPECT ENTAMOEBA HISTOLYTICA KIT** Ensaio ImunoEnzimático para *Entamoeba histolytica* em Microplaca é um ensaio para a detecção de EHSA.

**UTILIZAÇÃO**

**PROSPECT ENTAMOEBA HISTOLYTICA KIT** Ensaio ImunoEnzimático para *Entamoeba histolytica* em Microplaca destina-se à detecção qualitativa dos Antígenos Específicos da *E. histolytica* (EHSA) em extratos aquosos de amostras de fezes humanas. O ensaio detecta EHSA em cepas patogênicas e não patogênicas do organismo.

**PRINCÍPIO DE AÇÃO DO TESTE**

**PROSPECT ENTAMOEBA HISTOLYTICA KIT** Ensaio ImunoEnzimático para *Entamoeba histolytica* em Microplaca é um imunoensaio de fase sólida para a detecção dos EHSA (6). Amostras de fezes diluídas são colocadas nas cavidades da microplaca onde os anticorpos anti-EHSA estão ligados; se os EHSA estiverem presentes, eles serão "capturados" pelos anticorpos ligados. As cavidades são incubadas e lavadas, a fim de remover o material não-ligado, e os anticorpos anti-EHSA marcados com enzima peroxidase são adicionados. As cavidades são incubadas e lavadas, a fim de remover os anticorpos não-ligados marcados com enzima.

Em uma reação positiva os EHSA ligados aos anticorpos aderidos às cavidades, se ligam aos anticorpos marcados onde, com a adição do substrato para a enzima (TMB) e desenvolvida uma coloração do complexo anticorpo-antígeno-anticorpo marcado. O desenvolvimento de coloração pode ser detectado visualmente ou através do Leitor de ELISA.

Em uma reação negativa como não há EHSA ou o nível desses antígenos presentes na amostra é insuficiente para ligar os anticorpos marcados com enzima, não ocorre a ligação anticorpo-antígeno-anticorpo marcado e, por conseguinte, não se observa desenvolvimento de qualquer coloração.

**MATERIAIS E REAGENTES NECESSÁRIOS PARA A EXECUÇÃO DO ENSAIO:**

**PROSPECT ENTAMOEBA HISTOLYTICA KIT** Ensaio ImunoEnzimático para *Entamoeba histolytica* contém reagentes e materiais suficientes para realizar 48 ou 96 testes.

**48 / 96 testes**

<b>Microplaca</b>	<b>8 cavidades por tira</b>
Fixada com anticorpo anti-EHSA de coelho	6 tiras /12 tiras
<b>Conjugado Enzimático</b>	<b>1frasco 12 ml/25 ml</b>
Peroxidase marcada com anti-EHSA de coelho em uma matriz proteica contendo soro bovino e tимерosal 0,01%	<b>1 frasco 4,0 ml</b>
<b>Controle Positivo</b> Material fecal humano com tимерosal 0,02%	<b>1 frasco 4,0 ml</b>
<b>Controle Negativo</b> Material fecal humano com tимерosal 0,02%	<b>1 frasco 110 ml/110 ml</b>
<b>Tampão para Diluição da Amostra</b> Solução tamponada com tимерosal 0,02% e soro de coelho	<b>ml</b>
<b>Tampão para Lavagem</b> Solução tamponada 10x concentrada com tимерosal 0,1%	<b>1 frasco 110 ml/110 ml</b>
<b>Solução de Substrato TMB</b> em tampão	<b>ml</b>
<b>Solução Stop</b> Ácido hidrociorídico 0,5N (corrosivo)	<b>1 frasco 6 ml</b>

**Materiais necessários não fornecidos:**

Recipiente para coleta de amostras de fezes  
 Aplicadores com pontas de algodão ou rayon  
 Tubos de ensaio descartáveis  
 Cronômetro

Micropipeta para dispensar volumes até 200ul  
 Frasco de lavagem ou dispensador para tampão para lavagem  
 Água destilada ou deionizada

**Materiais opcionais não fornecidos:**

Leitor de ELISA (densidade ótica de 450nm)

Agitador de tubos (Vortex)

**CUIDADOS DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DOS REAGENTES**

As datas de fabricação e validade deste kit aparecem no rótulo da embalagem. Não utilizar reagentes cuja data de validade tenha expirado. Armazenar todos os reagentes, inclusive o Tampão para Lavagem concentrado entre 2 a 8° C. Devolver os reagentes não utilizados ao refrigerador ao completar o teste.

A Solução de Substrato é sensível à exposição à luz. Não usar reagente que tenha sido exposto à luz, tendo ocorrido o desenvolvimento de coloração azul. Caso seja retirada do frasco uma quantidade de Solução de Substrato, além da necessária para a execução do teste, a mesma não poderá ser devolvida ao frasco. Devolver todos as cavidades e tiras não utilizados ao envelope contendo dessecante. Este kit deverá ser transportado sob refrigeração.

**PRECAUÇÕES DE CUIDADOS ESPECIAIS**

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

Por se tratar de um ensaio qualitativo para a detecção dos antígenos específicos de *Entamoeba histolytica*, a intensidade da coloração desenvolvida não se correlaciona com o nível de antígenos ou o grau de infecção.

A Solução de Substrato é sensível à exposição à luz. Se o reagente for exposto à luz e desenvolver coloração, o mesmo deverá ser descartado.

Amostras, diluições de amostras e tiras de microplaca devem ser manuseadas de acordo com as diretrizes padronizadas para manuseio e descarte de materiais de perigo biológico. Os métodos adequados para esses fins devem ser estabelecidos pelo laboratório.

Utilizar pipetas ou ponteiros descartáveis separadas para cada Amostra, Controle e Reagente a fim de evitar contaminação cruzada, o que poderia causar resultados errôneos.

**NÃO** reutilizar as cavidades.

**NÃO** misturar ou trocar diferentes lotes de reagentes. Evitar contaminação microbiiana de reagentes e não utilizar reagentes que tenham sinais de contaminação.

O Tampão para Lavagem, o Conjugado Enzimático, o Controle Negativo e o Tampão para Diluição da Amostra contém tимерosal que pode irritar a pele, os olhos e as mucosas. Em caso de contato, lave os olhos ou a pele com quantidades abundantes de água.

Usar luvas descartáveis quando manusear amostras clínicas ou reagentes. Lavar sempre as mãos após trabalhar com material potencialmente infeccioso.

Já foi observado que a contaminação das cavidades com amido ou talco pode catalisar a auto-oxidação da Solução de Substrato. Portanto, a possibilidade desta contaminação deve ser eliminada.

A Solução Stop é corrosiva e deve ser manuseada com cuidado. Se esta solução entrar em contato com a pele ou a roupa, deve ser lavada imediatamente.

Não comer, beber, fumar, armazenar ou preparar alimentos, ou aplicar cosméticos dentro da área de trabalho onde reagentes e amostras estiverem sendo manuseados.

Pessoas dialíticas ou com deficiência visual talvez não consigam determinar visualmente o resultado do teste, devendo utilizar leituras do Leitor de ELISA para a interpretação dos resultados.

**COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS**

**Coleta das Amostras de Fezes**

As amostras de fezes não preservadas devem ser coletadas em recipientes de plástico limpos e selados, armazenadas de 2 a 8 ° C e testadas dentro de 48 horas. Se as amostras não puderem ser testadas dentro de 48 horas, as mesmas deverão ser congeladas de -20 a -70 ° C.

Amostras de fezes coletadas em Meio de Transporte Cary Blair deverão ser refrigeradas ou congeladas e testadas dentro de 1 semana após a coleta.

Amostras de fezes concentradas ou coletadas em formalina 10%, fixadores SAF ou PVA não são consideradas como adequadas para a realização deste ensaio.

**Preparo das Amostras para o Ensaio:**

Preparar as diluições das amostras como se segue:

1. Descongelar as amostras de fezes, quando for o caso. As amostras devem ser completamente emulsificadas, através da agitação vigorosa manual ou de Vortex, a fim de se garantir uma distribuição uniforme dos antígenos.
2. Rotular o número necessário de tubos com identificação do paciente.
3. Pipetar ou colocar 1 ml do Tampão para Diluição da Amostra em cada tubo.
4. Para amostras sólidas ou semi-sólidas, utilizar um "swab" completamente revestido com material fecal. Para amostras líquidas, usar 3 "swabs" ou 300 ul.

5. Girar o(s) aplicador(es) várias vezes no Tampão para Diluição da Amostra para causar a suspensão do material fecal em solução. Girar o(s) aplicador(es) firmemente contra a lateral do tubo a fim de retirar o máximo possível de fluido. Descartar os aplicadores de forma apropriada. As amostras preparadas podem permanecer no Tampão para Diluição da Amostra em temperatura ambiente (15 a 30 °C) até 8 horas ou no refrigerador (2 - 8 °C) até 48 horas antes do teste. O descarte da amostra deverá ser feito seguindo os procedimentos de segurança do seu laboratório.

#### PROCEDIMENTO DO ENSAIO

##### Informações Preliminares

Deixar que os reagentes e amostras cheguem à temperatura ambiente (15-30°C). Antes da utilização, deixar todos os reagentes chegarem à temperatura ambiente, agitando levemente. Devolver os reagentes não utilizados ao refrigerador após o uso.

Diluir o Tampão para Lavagem de 10x para 1x, adicionando 1 parte de concentrado para 9 partes de água destilada ou deionizada.

Adicionar os reagentes às cavidades do teste na mesma ordem durante todo o procedimento. A fim de evitar contaminação, não tocar no fluido das cavidades com as pontas dos frascos.

Cronometrar precisamente cada período de espera. Iniciar a cronometragem após acrescentar o reagente a última cavidade sobre cada placa do teste. A fim de garantir precisão na cronometragem, não processar mais de 3 placas de 96 cavidades de cada vez. Qualquer desvio do procedimento estabelecido pode alterar a performance do ensaio.

#### PROCEDIMENTO:

##### Antes de iniciar o Procedimento de Ensaio, ler Preparo das Amostras para o Ensaio e Informações Preliminares.

1. Remover o número necessário de tiras ou de cavidades individuais do envelope de papel de alumínio, colocando-os no suporte de tiras. Reservar uma cavidade para o Controle Positivo e outro para o Controle Negativo. **SELE NOVAMENTE O ENVELOPE A FIM DE EXCLUIR A UMIDADE, DEVOLVENDO AO REFRIGERADOR.**

2. Adicionar **4 gotas** (200 ul) de Controle Negativo, Controle Positivo ou amostra diluída do paciente dentro das cavidades individuais, tomando cuidado para não contaminar as cavidades adjacentes. O Controle Negativo pode ser colocado diretamente do frasco contendo gotas para a cavidade apropriada, e, se desejar, pipetar 200 ul do frasco.

3. Incubar a placa em temperatura ambiente (20-25°C) durante **60 minutos**. Começar a cronometrar após a adição da última amostra.

4. Decantar ou aspirar o conteúdo das cavidades. Lavar, preenchendo cada cavidade com Tampão para Lavagem diluído ( 350 - 400 ul/ cavidade). Remover ou aspirar todo o fluido das cavidades após cada lavagem. Lavar um total de **3 vezes**.

5. Acrescentar **4 gotas** (200 ul) de Conjugado Enzimático (tampa verde) a cada cavidade.

6. Incubar a placa à temperatura ambiente por **30 minutos**.

7. Decantar e lavar cada cavidade **5 vezes**, como no passo 4.

8. Acrescentar **4 gotas** (200 ul) de Solução de Substrato a cada cavidade.

9. Incubar a placa à temperatura ambiente durante **10 minutos**.

10. Acrescentar **1 gota** (50 ul) de Solução Stop a cada cavidade. Agitar as cavidades completamente até que o amarelo fique uniforme. Recomenda-se o uso de Vortex. Fazer a leitura das reações dentro de **10 minutos** depois de acrescentar a Solução Stop. Determinar o resultado visualmente ou através de Leitor de ELISA a 450 nm.

#### RESULTADOS VISUAIS:

##### Para a interpretação de cores, consultar o Cartão de Referência de Coloração do Ensaio.

1. Ler o Controle Negativo. A reação deve ser incolor. Se for constatada a cor amarela pálida, ou seja igual ou superior a 1+ do Cartão de Referência de Coloração do Ensaio, o teste deverá ser repetido com atenção ao procedimento de lavagem.

2. Ler o Controle Positivo. A intensidade da cor no Controle Positivo deve ser igual ou superior à reação 2+ do Cartão de Referência de Coloração do Ensaio.

3. Ler os resultados do teste, comparando com as cores de reação do Cartão de Referência de Coloração do Ensaio.

**Positivo:** cor amarela de intensidade de 1+, no mínimo

**Negativo:** incolor

#### 4. Interpretação de resultados visuais:

**Positivo:** Se a cor amarela de intensidade mínima 1+ aparecer na cavidade teste, a amostra contém EHSA o teste é positivo.

**Observação:** Não comparar a intensidade de desenvolvimento de coloração na cavidade de Controle Positivo. Testes com cor amarela fraca (inferior a 1+) deverão ser repetidos.

**Negativo:** Uma reação incolor é um resultado negativo e indica que o EHSA não está presente ou que o HSA existe a níveis indetectáveis na amostra.

#### LEITOR DE ELISA:

1. Assegurar que os fundos das cavidades estejam limpos antes da leitura, verificando que nenhum corpo estranho esteja presente nas cavidades. Colocar o espectrofotômetro (leitor de microplaca) para leitura a 450 nm.

2. Fazer a leitura da densidade óptica (D.O.) para o Controle Negativo. Para um teste válido, a D.O. do Controle Negativo deve ser de 0,100 ou inferior. Se a D.O. for maior que 0,100, os resultados são inválidos e o teste deverá ser repetido com atenção cuidadosa para o procedimento de lavagem.

3. Subtrair a D.O. da cavidade de Controle Negativo das leituras de D.O. da cavidade de Controle Positivo e das cavidades teste antes de interpretar os resultados.

**Observação:** Os leitores podem ser zerados na cavidade de Controle Negativo para que a D.O. da cavidade de Controle Negativo seja subtraída automaticamente das demais leituras. Se o leitor não tiver esta capacidade, zerar ao ar e subtrair a D.O. da cavidade de Controle Negativo das leituras de D.O. da cavidade de Controle Positivo e de cada uma das cavidades de teste antes de interpretar os resultados.

4. A D.O. para o Controle Positivo deverá ser 0,300 ou maior, após a subtração da D.O. do Controle Negativo. Se a D.O. for inferior a 0,300, o teste deverá ser repetido.

5. Ler os resultados do teste:

**Positivo:** D.O.  $\geq$  0,050 do valor zerado (i.e., após a subtração da D.O. do Controle Negativo)

**Negativo:** D.O.  $<$  0,050 do valor zerado (i.e., após a subtração da D.O. do Controle Negativo)

#### 6. Interpretação dos resultados do Leitor de ELISA:

**Positivo:** Se a leitura da D.O. do valor zerado for igual ou superior a 0,050 na cavidade teste, a amostra contém EHSA e o teste é positivo.

**Negativo:** Uma leitura da D.O. do valor zerado inferior a 0,050 é um resultado negativo e indica que EHSA não está presente ou que o HSA existe a níveis indetectáveis na amostra.

#### Limitações do Ensaio

Apenas um ensaio diagnóstico não deve ser utilizado como base única para se chegar a uma conclusão clínica. Os resultados devem ser fundamentados na correlação entre os resultados do ensaio diagnóstico, os sintomas e o quadro clínico geral do paciente. Quando resultados negativos forem obtidos para pacientes sintomáticos, novas amostras deverão ser coletadas e testadas.

#### CONTROLE DE QUALIDADE

Os Controles Positivos e Negativos devem ser incluídos a cada vez que o teste for realizado. O Controle Positivo e o Controle Negativo servem como controles de reagente e de procedimento.

#### VALORES EPIDEMIOLÓGICOS

A *Entamoeba histolytica* é uma ameba intestinal que causa infecção após a ingestão de cistos. Aproximadamente 12% da população mundial é infectada com a *E. histolytica* (1,7). Cerca de 90% dos indivíduos infectados apresentam infecções assintomáticas e constituem um grande reservatório do organismo. Aproximadamente 10% dos indivíduos infectados apresentam sintomas clínicos, que vão desde sintomas não específicos de doenças gastrintestinais até disenteria e colite. Desses indivíduos, aproximadamente 2 a 20% vão apresentar invasão extraintestinal e formação de abscessos, especialmente no fígado (1,7).

Nos Estados Unidos, uma média de 3.500 casos de amebíase são reportados anualmente aos Centros de Controle de Doenças (2). Os grupos considerados de alto risco são viajantes, imigrantes, trabalhadores migratórios, pessoas imunocomprometidas, pacientes de instituições psiquiátricas e homossexuais ativos do sexo masculino. Entre os últimos, predomina a cepa não patogênica do organismo (5). Os portadores de cepas patogênicas representam um reservatório importante para transmissão (1).

#### CARACTERÍSTICAS DE PERFORMANCE

##### Sensibilidade e Especificidade

A performance kit PROSPECT ENTAMOEBA HISTOLYTICA Ensaio ImunoEnzimático para *Entamoeba histolytica* em Microplaca (EIE) foi determinada com 268 amostras fecais congeladas frescas. Um grande laboratório de referência forneceu 105 amostras positivas para *Entamoeba histolytica* pelo EPF.

Essas amostras foram congeladas e armazenadas durante aproximadamente 2 - 3 anos, antes do teste do ensaio em microplaca. Do total 91 foram positivas por EPF e EIE e 14 negativas por EIE.

Foram utilizadas 163 amostras frescas congeladas, negativas pelo EPF para *E. histolytica*. Essas amostras foram armazenadas durante aproximadamente 6 meses. Dentre elas, 48 continham outros parasitas, que não *E. histolytica*. Todas as 48 amostras foram negativas para *E. histolytica* por EIE. As demais 115 amostras não continham parasitas pelo Exame Parasitológico de Fezes (EPF); 114 foram negativas pelo EIE e uma foi positiva.

As características de performance do PROSPECT ENTAMOEBA HISTOLYTICA KIT Ensaio ImunoEnzimático para *Entamoeba histolytica* em Microplaca são resumidas abaixo. A sensibilidade real do ensaio pode ser mais alta do que o valor abaixo, devido à ocorrência de identificações pelo EPF falso positivos, muitas vezes observadas (2).

ProSpect	+	-	
<i>Entamoeba histolytica</i>	91	1	268
	14	162	
	105	163	

Sensibilidade = 87% Valor Positivo Preditível = 99%

Especificidade = 99% Valor Negativo Preditível = 92%

#### Sensibilidade Analítica

PROSPECT ENTAMOEBA HISTOLYTICA KIT Ensaio ImunoEnzimático para *Entamoeba histolytica* em Microplaca detecta aproximadamente 40 nanogramas/ml de EHSA.

#### Reação Cruzada

PROSPECT ENTAMOEBA HISTOLYTICA KIT Ensaio ImunoEnzimático para *Entamoeba histolytica* em Microplaca foi testado com amostras de fezes positivas pelo EPF para diversos parasitas fecais. Não foi observada reação cruzada com nenhum dos agentes infecciosos abaixo:

<i>Ascaris lumbricoides</i> (4)	<i>Entamoeba hartmanni</i> (2)	<i>Isospora</i> sp. (2)
<i>Blastocystis hominis</i> (5)	<i>Endolimax nana</i> (4)	<i>Strongyloides stercoralis</i> (2)
<i>Chilomastix mesnili</i> (1)	<i>Giardia lamblia</i> (5)	<i>Taenia</i> sp. (1)
<i>Cryptosporidium parvum</i> (6)	<i>Ancilostomo</i> (1)	<i>Trichuris hominis</i> (2)
<i>Dientamoeba fragilis</i> (5)	<i>Hymenolepis nana</i> (1)	<i>Trichuris trichiura</i> (4)
<i>Entamoeba coli</i> (4)	<i>Iodamoeba butschlii</i> (1)	

Os números entre parênteses indicam os números de amostras testadas.

#### Reprodutibilidade e Repetitividade

O coeficiente de variação inter-ensaio do PROSPECT ENTAMOEBA HISTOLYTICA KIT Ensaio ImunoEnzimático para *Entamoeba histolytica* em Microplaca foi avaliado com quatro amostras positivas com leituras de densidade óptica variáveis. Cada amostra foi testada em 8 cavidades por dia, durante 5 dias consecutivos. O Coeficiente de Variação inter-ensaio médio foi de 4,8%.

Amostra	D.O. Média	Desvio Padrão	% CV
1	0,950	0,0210	2,20
2	0,620	0,0143	2,30
3	0,450	0,0355	7,90
4	0,260	0,0179	6,90

O CV intra-ensaio foi avaliado testando 24 cavidades com cada 4 amostras positivas. O CV intra-ensaio médio foi de 3,4%.

Amostra	D.O. Média	Desvio Padrão	% CV
1	1,086	0,0242	2,23
2	1,685	0,0242	3,54
3	0,481	0,0207	4,31
4	0,289	0,0100	3,50

#### BIBLIOGRAFIA

1. Bruckner, D.A., 1992. "Amebiasis." Clin. Micro. Rev. **5**(4):356-369.
2. Krogstad, D.J., Spencer, H.C., Healy, G. R., Gleason, N.N., Sexton, D.J., Herron, C.A., 1978. "Amebiasis: Epidemiologic Studies in the United States, 1971-1974." Ann. Int. Med. **88**:89-97.
3. Marsden, A.P.H. and Smith, H.F., 1946. "The detection of the cysts of *E. histolytica* in the feces by microbiology examinations." Med. J. Ant. II. 915-919.
4. Stamm, W.P., 1957. "The Laboratory Diagnosis of Clinical Amebiasis." Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **51**:306-312.

5. Tammich, E. and Burchard, G.D., 1991. "Differentiation of Pathogenic from Nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by Restriction Fragment Analysis of a Single Gene Amplified In Vitro." J. Clin. Micro. **29**(2): 250-255.

6. Tijssen, P., 1985. "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays." Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, R. H., Burdon and P. H., van Knippenberg, eds., Elsevier, N.Y. pp. 14-16.

7. Walsh, J.A., 1986. "Problems in Recognition and Diagnosis of Amebiasis: Estimation of the Global Magnitude of Morbidity and Mortality." Rev. Inf. Dis. **8**(2):228-238.

#### EDIÇÃO INSTRUÇÃO DE USO: MARÇO/2003