



Estandarización de la prueba de ELISA IgM en el diagnóstico de absceso hepático amebiano

Análida Elizabeth Pinilla¹
Myriam Consuelo López²
Blanca Castillo³, Olga Morales⁴
Patricia Reyes⁵, Santiago Nicholls⁶
Sofía Duque⁷
Fernando de la Hoz⁸

Resumen

Objetivo: estandarizar la técnica de ELISA IgM en el diagnóstico de absceso hepático amebiano. **Diseño:** estudio retrospectivo/prospectivo, descriptivo, transversal, de tecnologías diagnósticas para diferenciar etiología en absceso hepático. **Lugar:** pacientes de diferentes zonas del país. **Población:** se recolectaron tres grupos: primero, pacientes con absceso hepático amebiano, absceso hepático no amebiano o absceso hepático mixto; segundo, pacientes asintomáticos para amebiasis intestinal y extraintestinal; tercero, pacientes con hepatopatías diferentes. **Mediciones:** ELISA IgG, IgM, inmunodifusión y coprológico, se determinó el punto de corte para IgM y tablas de contingencia de análisis comparativo. **Resultados:** se recolectaron 81 casos entre sintomáticos y asintomáticos. Absceso hepático amebiano 34, promedio de edad 36; absceso hepático no amebiano 18, promedio de edad 45; absceso hepático mixto 4; asintomáticos 23, rango de edad 5 - 49 y otras hepatopatías 2

(absceso por *Ascaris lumbricoides* y ecografía hepática falsa positiva) con ELISA IgG e IgM (-). Punto de corte ELISA IgM (+) $e \gg 0.511$. Sintomáticos con absceso hepático amebiano y absceso hepático mixto ELISA IgG e IgM (+) 21% e IgG (+) pero IgM (-) 79%; absceso hepático no amebiano ELISA IgG e IgM (-) 100%. Pacientes asintomáticos con complejo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* y otros parásitos 100% (5/5) ELISA IgM (-) tanto los de ELISA IgG (+) 2 como IgG (-) 3 pacientes. **Conclusiones:** la prueba de ELISA IgG sigue siendo una herramienta diagnóstica para discernir etiología amebiana en absceso hepático. Se determinó el punto de corte para ELISA IgM con valor $e \gg 0.511$ para el diagnóstico de absceso hepático amebiano con sensibilidad de 18% pero con especificidad de 100% y valor predictivo positivo de 100%. **Palabras clave:** absceso hepático, absceso hepático amebiano, *Entamoeba histolytica*, ELISA IgG e IgM. Ⓢ

Infectio 2004; 8(3):203-209

Recibido para evaluación: 15/03/2004 - Aceptado para publicación: 9/08/2004

- ¹ MD. Internista. MSc. Educación. Especialista Evaluación. Departamento de Medicina Interna. Universidad Nacional de Colombia.
- ² Bacterióloga. MSc. Microbiología. Especialista Microbiología Médica. Departamento de Salud Pública y Tropical Universidad Nacional de Colombia.
- ³ Bacterióloga. Departamento de Medicina Interna. Universidad Nacional de Colombia.
- ⁴ Bacterióloga. Estudiante Maestría de Infecciones y Salud en el Trópico.
- ⁵ MD. MSc. Medicina Tropical. Departamento de Salud Pública y Tropical. Universidad Nacional de Colombia.
- ⁶ MD. MSc. Medicina Tropical. Departamento de Salud Pública y Tropical. Universidad Nacional de Colombia. Instituto Nacional de Salud.
- ⁷ Bióloga. MSc. Medicina Tropical. Instituto Nacional de Salud.
- ⁸ MD. MSc. Epidemiología. PhD. Epidemiología. Departamento de Salud Pública y Tropical. Universidad Nacional de Colombia.

Financiación: División Investigación Sede Bogotá. Universidad Nacional de Colombia, código 809159.
Correspondencia: Análida E. Pinilla Roa. Calle 53 B #24-80. Oficina 306. Telefax: 3165000 extensión 15167.
Correo electrónico: aepinillar@unal.edu.co ; apinilla@supercabletv.net.co

Introducción

La infección por *Entamoeba histolytica* puede ser asintomática en 90% o sintomática 10% con disentería y amebiasis extraintestinal; en Colombia se reportó una prevalencia de 12,1% en 1980 (1,2). Sin embargo, el 1% de las personas infectadas pueden desarrollar patologías potencialmente fatales como la colitis amebiana fulminante o el absceso hepático amebiano (AHA) el cual constituye un serio problema de salud pública con una mortalidad del 2-10% en áreas endémicas como Birmania, China, India, Sur África, Colombia, México y Venezuela (3).

Debido a las dificultades para diferenciar la etiología del absceso hepático (AH) y diagnosticar AHA, se han desarrollado diversas pruebas como la hemoaglutinación indirecta (HAI) (4), inmunodifusión (ID) (5), ELISA (6) y Western-Blot (WB) (7) entre otras. Actualmente, se utiliza la reacción en cadena de polimerasa (RCP) (8) y en nuestro medio la prueba empleada es ELISA IgG (6).

Dada la persistencia de títulos positivos por años para IgG detectada por ELISA en áreas endémicas, es necesario correlacionar el cuadro clínico con la prueba. Una ELISA IgG (+) contra *E. histolytica* no puede diferenciar una infección aguda de una pasada en áreas endémicas, aún no se cuenta con una prueba que permita diferenciar infección reciente de pasada (9,10). Por lo anterior, se hizo necesario adaptar el ELISA IgM en pacientes con AHA.

Materiales y Métodos

Estudio retrospectivo/prospectivo, descriptivo, transversal, de tecnologías diagnósticas para diferenciar etiología en absceso hepático (11). Prueba de referencia: ELISA IgG para *E. histolytica* con punto de corte ≥ 0.34 (6).

Población y muestra

Se recolectaron 81 casos distribuidos en 3 grupos, entre sintomáticos y asintomáticos. Pacientes sintomáticos 56 con AH, asintomáticos 23 y 2 con otras hepatopatías cuyos sueros estaban conservados a -20° C en el banco de la Unidad de Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia. A las muestras se les realizó ELISA IgG, IgM, inmunodifusión (ID) (12) y coprológico. Agrupados así:

Primer grupo, de 56 *pacientes sintomáticos* con absceso hepático (AH): 34 con AHA; 18 con

absceso hepático no amebiano (AHNA) y 4 con absceso hepático mixto (AHM) (9).

Segundo grupo, 23 pacientes asintomáticos para amebiosis intestinal y extraintestinal, procedentes de zona rural, municipio de Quipile (Cundinamarca).

Tercer grupo, 2 pacientes con hepatopatía diferente, de posible reacción cruzada con ELISA IgG e IgM negativas; AH por *Ascaris lumbricoides* y ecografía hepática falsa positiva (9).

Aspectos éticos: se obtuvo consentimiento informado de los adultos o de los representantes legales de los menores, cumpliendo con lo prescrito según la Declaración de Helsinki, la Resolución No 008430 del Ministerio de Salud y el Decreto 2737 de 1989 del Código del Menor.

Se consideraron los siguientes grupos de variables *socio-demográficas*: edad, género y procedencia; *exámenes de laboratorio*: ELISA IgG e IgM y examen coprológico por los métodos directo y concentración (6,9).

Examen directo en solución salina fisiológica y coloración con lugol

Se adicionaron alrededor de 1 ó 2 mg de materia fecal tanto en una gota de solución salina fisiológica (13) como en una de lugol (14). Se cubrieron las preparaciones con una laminilla 22 x 22 mm y se examinó toda el área bajo la laminilla, sistemáticamente, en aumento de 100X - 400X.

Concentración de formol-éter

Se adicionaron 12 ml de formol 10% a 2gr de materia fecal y se homogenizó la muestra. Se filtró el homogenizado y se le agregaron 2-3 ml de éter etílico. Se agitó la mezcla vigorosamente durante 1-2 minutos y se centrifugó a 1000 g. Se examinó al microscopio, el sedimento en una gota de lugol (15).

Inmunodiagnóstico

Se recolectaron 2 ml de sangre y se centrifugaron a 250 g durante 5 minutos, se separó el suero de la muestra y se almacenó a -20° C. Luego se obtuvo el antígeno a partir de la cepa HM1 de *E. histolytica*, se determinaron las diluciones óptimas de: suero, Anti IgM humana unida a fosfatasa alcalina y concentración de antígeno.



El antígeno de *E. histolytica* se preparó a partir de la cepa HM1, fue obtenido a partir de trofozoítos cultivados en medio BI-S-33, suplementado con mezcla vitamínica 107 (16,17).

Los trofozoítos fueron cosechados a partir de los cultivos por centrifugación a 700 g durante 5 minutos a 4°C y lavados 5 veces con solución salina fisiológica estéril, pH 7.2 a 250 g a 4°C, durante 5 minutos cada lavado. Los parásitos fueron sometidos a procesos de congelación (-196°C) y descongelación (4°C), tres veces consecutivas. Finalmente fueron sonicados en hielo durante 30 segundos a 20 kHz, repitiendo este procedimiento 5 veces en un equipo (Biosonik IIA). Para la separación, se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos a 4°C y se determinó la concentración de proteínas del sobrenadante por el método de Lowry, se distribuyó en alícuotas de 200 ul y se almacenó a -20°C.

Para la adaptación del ELISA IgM se seleccionó el suero positivo de un paciente con diagnóstico de AHA confirmado por manifestaciones clínicas, ecografía hepática, anticuerpos positivos contra *E. histolytica* y respuesta al tratamiento con nitroimidazol (8) y una muestra negativa de un individuo sano sin antecedentes de disentería amebiana, ni AHA. Estas dos muestras fueron utilizadas durante la estandarización, determinándose la concentración óptima de antígeno, diluciones de suero y conjugado contra IgM humana.

Se utilizaron placas de poliestireno "Dynatech Immunolon I". A cada pozo se le agregaron 100 ul de antígeno diluido en solución reguladora de carbonato (0.05M, pH 9.6) en los rangos de 0.5 – 7.5 mg/ml, por triplicado. Después de tres horas de incubación en cámara húmeda a temperatura ambiente, cada microplaca fue lavada tres veces consecutivas durante 5 minutos con solución reguladora de fosfatos PBS (0.15M, pH 7.4), que contenía 0.05% de Tween 20 (PBS-T). Se agregaron 100 ul de suero positivo y negativo por triplicado, en diluciones que variaban entre 1:400, 1:800, 1:1600 y 1:3200. La microplaca se colocó en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente se lavó tres veces con PBS-T. Se agregaron 100 ul de conjugado unido a fosfatasa alcalina, en diluciones en el rango de 1:800, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:10.000 y 1:15000 por triplicado y la microplaca se incubó durante 18 horas a 4°C. Una vez terminado este periodo se hicieron 3 lavados como se describió previamente.

A continuación, se adicionaron 100 ul por pozo de para-nitro-fenil-fosfato en una relación de 1mg/ml en solución reguladora de dietanolamina (0.1M, pH 9.8) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, al cabo de los cuales se detuvo la reacción mediante la adición de 25 ul de NaOH 3N, a cada pozo. La presencia de los anticuerpos fue determinada por la absorbancia a 405 nm en un colorímetro Uniskan II (6).

Análisis estadístico

Para establecer el punto de corte para ELISA IgM se sumaron los valores de las absorbancias en las muestras de *pacientes sintomáticos y asintomáticos*. Para la discriminación diagnóstica de IgM se calculó el valor de la media, la mediana y los percentiles 25 y 75 de los valores de absorbancia de IgM para los pacientes con diagnóstico confirmado de AH y para los negativos (todos con ELISA IgG negativa), porque la prueba de ELISA IgG es la prueba de oro o de referencia (6,18). Luego se eligieron varios puntos potenciales de corte, usando los valores de estas distribuciones y para cada uno de ellos se construyeron tablas de contingencia para calcular sensibilidad y especificidad de los diferentes puntos de corte. Luego se procedió a realizar las tablas de contingencia, para hacer análisis descriptivo comparativo de ELISA IgM con relación a ELISA IgG para cada uno de los grupos; de igual forma se procedió para comparar el ELISA IgG e IgM con el resultado del coprológico (19). La base de datos y el análisis se realizó en Microsoft Excel 2000 y en Epi Info 6.4.

Resultados

En este estudio se recolectaron 81 casos entre sintomáticos y asintomáticos. Los sintomáticos, primer grupo AHA 34, AHM 4, AHNA 18 y tercer grupo con otras hepatopatías 2 (AH por *Ascaris lumbricoides* y ecografía hepática falsa positiva para AH, negativos para ELISA IgG e IgM) y los asintomáticos, segundo grupo, de 23 pacientes.

La ID fue positiva (91% de pacientes con AHA y 100% de AHM) y negativa (100% de AHNA y asintomáticos). El promedio de edad para AHA, AHNA y asintomáticos fue 36, 45 y 20 años y la relación hombre-mujer de 24/5, 11/5 y 9/14 respectivamente.

Estandarización ELISA IgM:

La concentración óptima de antígeno de *E. histolytica* fue de 1.25 ug/ml, dilución óptima de

suero de 1:800 y de conjugado 1:10.000. Para el punto de corte se analizaron 41 muestras que eran IgG negativas, se sacó el promedio del ELISA IgM y se aplicaron dos desviaciones estándar para obtener el punto de corte e» 0.54. Al utilizar diferentes puntos de corte basados en la distribución de percentiles encontramos que con un punto de corte de 0.20 la sensibilidad de la IgM era de 68% y la especificidad 67%, con un punto de corte e» 0.511 la sensibilidad 18% y la especificidad 100%.

Las tabla 1-3 muestran la distribución de sintomáticos y asintomáticos. En las tablas 2 y 3 se presentan los pacientes asintomáticos que tenían alguno de los siguientes parásitos: *Giardia duodenalis*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*,

Endolimax nana, *Iodoamoeba bustschlii*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Uncinaria sp* y *Blastocystis hominis*.

Discusión

En Colombia la prueba estandarizada de ELISA IgG es de bajo costo y está disponible en algunas capitales y centros de referencia del país (6). Otros investigadores han usado la prueba de ELISA para la determinación de IgG, IgM, Ig A y subtipos de IgG en sueros de pacientes infectados con *E. histolytica* en áreas endémicas (20). En este sentido, diversos autores han encontrado que los sueros de pacientes con colitis amebiana y AHA tienen valores más altos, en todos los subtipos de

TABLA 1

Comparación ELISA IgM - IgG de pacientes sintomáticos

ELISA	AHA-AHM*		AHNA	
	IgG (+)	IgG (-)		
IgM ≥ 0.511 (+)	8 (21%)	1 (6%)		9
< 0.511 (-)	30 (79%)	17 (94%)		47
Total	38	18		56

* AHM 4 con ELISA IgG (+) e IgM (-).

TABLA 2

Comparación de ELISA IgM - IgG de pacientes asintomáticos*

ELISA	Complejo <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>		
	IgG (+)	IgG (-)	
IgM ≥ 0.511 (+)	0	0	0
< 0.511 (-)	2	3	5
Total	2	3	5

*Complejo *E. histolytica* / *E. dispar* (+).

TABLA 3

Comparación ELISA IgM - IgG de pacientes asintomáticos*

ELISA	Complejo <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>		
	IgG (+)	IgG (-)	
IgM ≥ 0.511 (+)	1 (6%)	1 (6%)	2
< 0.511 (-)	1 (6%)	15 (82%)	16
Total	2	16	18

*Complejo *E. histolytica* / *E. dispar* (-).



anticuerpos, en comparación con los individuos sanos (10). Dada la persistencia de títulos positivos por años para ELISA IgG en áreas endémicas no se puede diferenciar una infección aguda de una pasada, por tanto es necesario correlacionar el cuadro clínico con el resultado de ésta, razón por la cual se propuso estandarizar ELISA IgM (6,9).

Para estandarizar el ELISA IgM las condiciones de la concentración óptima y diluciones fueron similares a los de la prueba de ELISA IgG estandarizada por Nicholls y colaboradores (6). Se compararon los 38 pacientes sintomáticos (AHA o AHM) encontrándose que el 21% presentaron simultáneamente IgG e IgM positivas y 1 de los pacientes 18 con AHNA presentó IgM positiva. Shetty y colaboradores reportaron títulos altos de IgG (+) pero IgM (+) con títulos bajos en pacientes con AHA (21). En el mismo sentido Hock y colaboradores informaron el 43.6 % de positividad para IgM en contraste con el 97.4% para IgG (20), hallazgos similares fueron encontrados en el estudio realizado por Pinilla y colaboradores que reportaron el 100% de positividad para IgG. Además, es importante analizar que los cuatro pacientes con AHM presentaron IgM negativa, lo que induce a pensar que es posible que estos pacientes tenían un AHNA y que el ELISA IgG positivo era memoria inmunológica (9).

Por otra parte, dado que el AHA suele ser una patología crónica, el 76% de los pacientes con AHA fueron negativos para IgM ya que esta es de respuesta inmunológica primaria. Es así como Jakson y colaboradores encontraron en 56 pacientes con AHA IgG (+) en el 100% e IgM (+) en el 40%, los niveles de IgM se negativizaron más rápido que los de IgG; los hallazgos sugirieron que la presencia de IgM (+) junto a IgG (+) es indicativa de infección activa (22). En el mismo sentido, Baveja y colaboradores, en un estudio de la cinética de IgG e IgM en pacientes con AHA encontraron que lo niveles de IgM específica declinaron significativamente en tres meses mientras que los títulos de IgG persistieron, es así como los anticuerpos IgM parecen ser indicador de actividad en amebiosis invasiva (23).

Al comparar muestras de pacientes asintomáticos para amebiosis, con presencia del complejo *E. histolytica*/*E. dispar* se encontró que todos tenían IgM (-), 2/5 presentaron IgG (+) con IgM (-) y los 3 restantes mostraron tanto IgG como IgM (-). Estos resultados permiten inferir que la IgM

se eleva cuando ha habido contacto tisular con *E. histolytica* (10).

De los individuos asintomáticos negativos para el complejo *E. histolytica* / *E. dispar* el (82%) presentaron ELISA IgG e IgM (-) y 2 presentaron IgM (+) esto hace pensar que el ELISA IgM pueda tener reacción cruzada con otras patologías. Shetty y colaboradores, han informado estudios de amebiosis con anticuerpos monoclonales que posiblemente al ser más específicos no presenten reacción cruzada a diferencia de los componentes de la técnica utilizada en este estudio con anticuerpos policlonales (21). Por tanto, una vez más, se reconfirma la importancia de la historia clínica para correlacionarla con los resultados de laboratorio con el fin de definir el diagnóstico y el tratamiento del paciente.

Por tanto, se debe continuar la búsqueda de nuevas alternativas diagnósticas que le permitan al clínico establecer con mayor certeza el diagnóstico y el tratamiento en forma oportuna y adecuada si el paciente presenta infección por *E. histolytica*. Es importante tener en cuenta, que se puede diferenciar una infección por *E. histolytica* reciente de una pasada, mediante las técnicas de biología molecular, las cuales están en investigación en otros países y por ahora no pueden ser utilizadas cotidianamente en nuestro medio (8,10).

En conclusión, la prueba de ELISA IgG sigue siendo una herramienta diagnóstica para discernir la etiología amebiana en absceso hepático. Se determinó el punto de corte para ELISA IgM con una absorbancia ≥ 0.511 para el diagnóstico de absceso hepático amebiano con una sensibilidad del 18%, una especificidad del 100% y un valor predictivo positivo del 100%. *

Agradecimientos

A la División de Investigaciones Sede Bogotá (código 809159), a la profesora Martha Murcia y Diego Viasus residente de segundo año de Medicina Interna de la Universidad Nacional de Colombia y al profesor Luis Carlos Orozco de la UIS.

Abstract

Objective: to standardize the IgM antibody detection ELISA test for diagnosis of amebic liver abscess. **Design:** retrospective/prospective, cross sectional descriptive study of diagnostic techniques

for establishing the amebic etiology of infectious liver abscess. **Place:** patients from different regions of Colombia. **Population:** patients were classified into three groups: Group 1: patients with amebic liver abscess, non-amebic liver abscess or mixed liver abscess; Group 2: asymptomatic patients for intestinal or extraintestinal amebiasis; Group 3: patients with different liver abnormalities. **Measurements:** ELISA IgG, IgM, ID and stool examination; the cut-off value for IgM was established and 2 x 2 tables were done for comparative analysis. **Results:** 81 cases, either symptomatic or asymptomatic were studied; Amebic liver abscess: 34 patients, average age 36; non-amebic liver abscess: 18 patients, average age: 45; mixed liver abscess 4 patients; asymptomatic patients 23, age range: 5-49; other liver abnormalities: 2 patients with negative ELISA IgG-IgM (1 abscess caused by *Ascaris lumbricoides* and one false positive liver ultrasound). Cut-off for positive IgM ELISA test: ≥ 0.511 . 21% of symptomatic patients with either amebic or mixed liver abscess had a positive IgM-ELISA test and 79% had a positive IgG-ELISA but a negative IgM-ELISA; 100% of the non-amebic liver abscess patients had negative IgG and IgM ELISA tests. All (5%) the asymptomatic patients with a positive stool examination for the *E. histolytica/E. dispar* complex and other intestinal parasites had a negative IgM-ELISA test, including two of them with a positive IgG-ELISA and three with a negative IgG-ELISA. **Conclusion:** the IgG-ELISA test continues to be a good diagnostic tool for confirming the amebic etiology of infectious liver abscess. The Ig-M ELISA test for amebic liver abscess had a cut-off point of 0.511; its sensitivity was 18%, its specificity 100% and its positive predictive value 100%. **Key words:** liver abscess, amebic liver abscess, *Entamoeba histolytica*, IgG and IgM ELISA.

Referencias

1. Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of Amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev Inf Dis 1986; 8: 228-35.
2. Cáceres E, Castaño de Romero L, Estupiñán D, López MC, Páez S, Pinilla CA, Santacruz MM. En: Corredor A, Arciniégas E, Hernández CA eds. Parasitismo Intestinal. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. Santa Fé. de Bogotá: Instituto Nacional de Salud, 2000; 67-8.
3. WHO Meeting. Amoebiasis and its control. Bull WHO 1985; 63: 417-26.
4. Kessel JF, Lewis WP, Solomon MA, Kim H. Preliminary report on a hemagglutination test for *Entamoeba*. Proc Soc Exp Biol Med 1961; 106: 409-13.
5. Maddison SE. Characterization of *Entamoeba histolytica* antigen-antibody reaction by gel diffusion. Exp Parasitol 1965; 16: 224-35.
6. Nicholls RS, Restrepo MI, Duque S, López MC, Corredor AA. Standardization and evaluation of ELISA for the serodiagnosis of Amoebic Liver Abscess. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89: 53-8.
7. Argüello GR, Sánchez G MC, Garduño G, Valadez-Salazar A, Martínez-García MC, Muñoz O, et al. Evaluation of an Immunoblot methodology for the detection of relevant *Entamoeba histolytica* antigens by antibodies induced in human amebiasis. Arch Invest Med 1990; 21: 3-9.
8. 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* 1999; 37:3034-36.
9. Pinilla AE, López MC, Castillo B, Murcia MI, Nicholls RS, Duque S, Orozco LC. Evaluación Clínica, Imagenológica e Inmunológica del Absceso Hepático. Acta Med Colomb 2002; 27: 15-25.
10. Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri WA Jr. Amebiasis. Review. N Engl J Med. 2003 Apr 17;348(16):1565-73.
11. Orozco LC, Camargo D. Evaluación de tecnologías diagnósticas y tipos de muestreo: Biomédica 1997; 17: 321-24.
12. Ouchterlony O. In vitro method for testing the toxin producing capacity of *Diphtheria bacteria*. Acta Pathol Microbiol Scand 1948; 25: 186.
13. Manson-Bahr PEC, Bell DR. Manson's tropical diseases 19th ed. London: Bailliere Tindall, 1987.
14. Department of Medical Protozoology. London School of Hygiene and Tropical Medicine. Hand-outs. Parasitology Diagnosis. Public Health Laboratory Services. London: 1989: 8.
15. Ridley DS, Hawgood BC. The value of formol-ether concentration of faecal cysts and ova. J Clin Pathol 1956; 9: 74-6.
16. Diamond LS, Harlow DR, Cienneek CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1978, 72:431-32.
17. Evans VJ, Bryant JC, Fioramonti MC, McQuilkin WT, Sandford KK, Earle WR. Studies of Nutrient media for tissue cells in vitro. I. A protein-free chemically defined medium for cultivations of strains. I Cell Cancer Res. 1956, 16:77-86.
18. Kurstak E. Progress in enzyme immunoassays: production of reagents experimental design, and interpretation. Bull WHO 1985; 63: 793-811.



19. **Kahn A and Semphos A.** Statistical methods for Epidemiology. Oxford University Press. Second edition. New York. 1992.
20. **Hock GM, Foon KL, Chuen HL, Choo NG,** Singh M. Determination on antiamebic IgG, IgM, IgA and IgG subclasses in sera from patients with amoebiasis by enzyme - linked immunosorbent assay. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1989; 20: 407-14.
21. **Shetty N, Nagpal S, Rao PV, Schroder H.** Detection of IgG, IgA, IgM and IgE in antibodies in
invasive amoebiasis in endemic areas. Arch Invest Med 1990; 21 Suppl 1:41-6.
22. **Jackson TF, Anderson CB, Simjee AE.** Serological differentiation between past and present infection in hepatic amoebiasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1984; 78:342-5.
23. **Baveja UK, Makkar BM, Kaur M, Agarwal SK.** Kinetics of specific IgM in patients of hepatic amoebiasis. Indian J Med Res 1992; 95:190-4.