

# *Entamoeba histolytica* – nebezpečný střevní prvok

## III. část – odběr biologického materiálu a laboratorní diagnostika patogenní améby

Zuzana Čermáková<sup>1,2</sup>, Zbyněk Valenta<sup>2</sup>, Barbora Voxová<sup>1</sup>, Vladimír Buchta<sup>1</sup>, Miroslav Förstl<sup>1</sup>,  
Vítězslava Roučková<sup>3</sup>, Lenka Plíšková<sup>4</sup>, Radka Bolehovská<sup>4</sup>, Petr Prášil<sup>5</sup>, Stanislav Plíšek<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Ústav klinické mikrobiologie, LF UK a FN Hradec Králové

<sup>2</sup>Ústřední vojenský zdravotní ústav Praha, Centrum biologické ochrany, Těchonín

<sup>3</sup>Axis-CZ HK, s.r.o., Hematologické a biochemické laboratoře, Hradec Králové

<sup>4</sup>Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF UK a FN Hradec Králové

<sup>5</sup>Klinika infekčních nemocí, LF UK a FN Hradec Králové

### Souhrn

Laboratorní diagnostika infekce *E. histolytica* je odlišná v případě intestinální a extraintestinální formy onemocnění. U střevní amebiázy vyšetřujeme vzorek čerstvé průjmovité stolice na přítomnost trofozoitů a formovanou stolici na přítom-

nost cyst. Při nálezu suspektních útvarů ve stolici provedeme průkaz DNA *E. histolytica* metodou PCR (polymerázová řetězová reakce). Při podezření na extraintestinální amébový absces je vhodné sérologické vyšetření na průkaz protilátek proti *E. his-*

*tolytica* a v případě evakuace obsahu abscesu vyšetření detritu metodou PCR pro průkaz DNA patogenní améby.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** ENTAMOEBA HISTOLYTICA, LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA, DNA, PCR

### Summary

**Entamoeba histolytica – a dangerous intestinal protozoan. Part III – sampling of the biological material and laboratory diagnostic of the pathogenic amoeba)**

Laboratory diagnostics of *E. histolytica* infection differs according to specific – intestinal or extra intestinal – form of illness.

Speaking of intestinal form a fresh diarrhoeal stool sample is examined with the aim to find appearance of trophozoites and form stool sample is examined for cysts. When suspicious formation is discovered DNA proof by PCR reaction is conducted. If extra intestinal form is considered serologi-

cal examination for specific antibodies against *E. histolytica* is recommended and in case of abscess's evacuation PCR for DNA of pathogenic amoebas is advisable.

**KEY WORDS:** ENTAMOEBA HISTOLYTICA, LABORATORY DIAGNOSTICS, DNA, PCR

### DIAGNOSTIKA AMÉB

Laboratorní diagnostika infekce patogenní amébou *Entamoeba histolytica* je odlišná pro střevní infekci a pro extraintestinální amébový absces, neboť v době, kdy je absces vytvořen, se améby již ve většině případů ve střevě nenacházejí, a nelze je tedy vyšetřením stolice prokázat. Tato skutečnost je pro zvolení správné laboratorní metody významná, stejně jako fakt, že při střevní infekci nejsou tvořeny specifické protilátky, které by bylo možné využít v laboratorní diagnostice. Protilátky se ovšem tvoří při extraintestinální formě onemocnění.

Základem laboratorní diagnostiky střevní amebiázy (amébové dysenterie) je parazitologické vyšetření čerstvé stolice (označované rovněž jako koprologické vyšetření). Vzorek průjmové stolice, v níž můžeme očekávat pouze trofozoity, by měl být do laboratoře dopraven nejpozději 1–2 hod po defekaci a nesmí být vystaven chladu (musí se přepravovat v teple, např. v termosce) [6]. Cysty lze prokázat ve formované stolici, která by měla být vyšetřena do 24–48 hod po odběru. Do laboratorního vyšetření uchovááme tento typ vzorku při chladničkové teplotě (nesmí zmrznout).

Cysty *Entamoeba histolytica* je nezbytné identifikovat v podstatě ze dvou důvodů:

1. Vzhledem k vývojovému cyklu *Entamoeba histolytica* (přeměna v agresivního trofozoita po stresové reakci) je nutné z hlediska zdraví vlastního nosiče eliminovat cysty z trávicího traktu.
2. Nosičství cyst patogenní améby umožňuje jejich šíření na další zdravé osoby kontaminací rukou, vody a potravin [1].

### PREANALYTICKÁ FÁZE

Je nutné mít na zřeteli, že výsledek

parazitologického vyšetření stolice může být negativně ovlivněn řadou faktorů již v tzv. preanalytické fázi, tedy v době před vlastním laboratorním vyšetřením. Velmi důležité je uchovávání vzorků s ohledem na vývojové stadium parazita, které je ve stolici přítomno. Průjmovitá stolice, v níž lze očekávat trofozoity a v níž se naopak vůbec nemusí vyskytovat cysty (nebyly vytvořeny díky zrychlené střevní pasáži a biologické proměně améby), musí být doručena do laboratoře do 1–2 hod po defekaci a ihned zpracována, výhodná je proto předchozí telefonická domluva s laboratoří a odběr vzorku v pracovní době. V případě, že je zde delší časová prodleva a vzorek je uložen v chladničce nebo při pokojové teplotě několik hodin, trofozoiti podlehnou destrukci, cysty nejsou přítomny a výsledek vyšetření bude falešně negativní.

Užití antibiotik, střevních dezinficiencí a chemoterapeutik ovlivňuje střevní mikroflóru, a tím i améby, které se nemusí vždy podařit prokázat. Po rentgenologickém vyšetření trávicího traktu s použitím barya je možná detekce parazitů až po deseti dnech [6].

Ke standardnímu parazitologickému vyšetření je optimální vzorek stolice o velikosti cca vlašského ořechu.

### DIAGNOSTICKÝ POSTUP V LABORATOŘI

Při vyšetření vzorku čerstvé stolice (k průkazu trofozoitů) připravujeme nejdříve nativní preparát, v němž lze pozorovat pohyblivé trofozoity, v případě amébové dysenterie i s pohlavními erytrocyty. Zároveň je nutno ihned zhotovit trvalý preparát barvený železitým hematoxylinem dle Heidenheina nebo trichromem dle Gomoriho. V barveném preparátu jsou dobře rozpoznatelné vnitřní struktury prvoka, a pokud se jedná o typické trofozoity *Entamoeba histolytica* typu magna (velikost okolo 40–60 µm) s pohlavními erytrocyty, můžeme provést druhovou identifikaci. Podobně je možno

vyšetřit seškrab sliznice provedený při rektoskopii nebo koloskopii.

Mikroskopická diagnostika barvených preparátů má určité limity, na které je nutno pamatovat. Pokud vyšetříme pouze jeden vzorek, bude senzitivita metody pouze kolem 60 %. Proto je nutné dodržovat „obecné parazitologické pravidlo“ a vyšetřit nejméně tři vzorky stolice odebrané s časovým odstupem 24–48 hod [3]. V mikroskopii améb může zkušený mikrobiolog využít některé velmi jemné a zajímavé biologické nuance mezi oběma druhy. V nativním preparátu z čerstvě odebrané stolice je např. u patogenní *Entamoeba histolytica* viditelný progresivní pohyb pomocí eruptivního vystřelování panožek (pseudopodií), zatímco nepatogenní *Entamoeba dispar* vysouvá panožky jakoby bezúčelně. Cysty obou druhů améb jsou morfologicky zcela shodné, a nelze je proto běžnými metodami rozlišit. Obecně je v mikroskopické diagnostice za klíčový považován „typický obraz amébové dysenterie“, při němž vzorek stolice obsahuje erytrocyty, leukocyty (přítomné i u jiných zánětů střeva). Za velmi významný je považován nález trofozoitů, které obsahují fagocytované erytrocyty. Ovšem podle některých autorů rovněž několik nepatogenních améb může příležitostně fagocytovat erytrocyty (především *Entamoeba coli*, která se vyskytuje ve vzorcích stolice relativně často, a také *Entamoeba moshkovski*) [3].

Materiál z biopsií je vyšetřován po histologickém zpracování. Lze se rovněž pokusit o kulturační záchyt améb z čerstvé stolice ve speciálních kulturačních médiích, metoda je náročná a v běžných diagnostických laboratořích není používána.

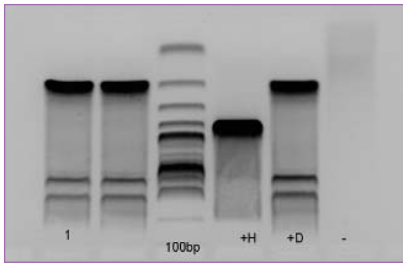
### IZOENZYMOVÁ ANALÝZA

Při záchytu cyst *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* je nezbytné rozlišit, zda se jedná o amébu patogenní či nepatogenní. Za „zlatý standard“ je i v dnešní době považována izoenzy-

mová analýza, pomocí níž je možné rozlišit druhově specifické elektroforetické profily čtyř enzymů. Výraznou nevýhodou izoenzymové analýzy je nutnost nejdříve améby kulturačně namnožit, a proto metoda není vhodná pro rutinní diagnostiku. Identifikační soupravy na rozlišení koproantigenů a vyšetření protilátek nelze považovat za dostatečně spolehlivé [5].

### POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

Pro rutinní vyšetřování lze využít některé modifikace polymerázové řetězové reakce [6]. PCR je v případě správného provedení velmi užitečná metoda, neboť citlivost reakce může být dokonce jeden trofozoit, zatímco EIA (ELISA) testy pro detekci antigenů mají citlivost řádově ve stovkách trofozoitů [2–4]. Metoda PCR je rovněž vysoce specifická. Při identifikaci cyst nalezených ve stolici metodou PCR bývají problémem četné inhibitory polymerázové řetězové reakce, které se ve stolici velmi často vyskytují [7]. Jednou z možností zvýšení senzitivity PCR odstraněním inhibitorů je opakované promývání cyst pufovaným fyziologickým roztokem (PBS), které je prováděno v laboratořích Ústavu klinické mikrobiologie LF UK a FN Hradec Králové. Vzorky stolice jsou zpracovány běžnou koncentrační metodou dle Fausta, barvením a v případě nálezu cyst suspektních pro *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* je provedena koncentrační metoda z jednoho vzorku stolice ve třech zkumavkách paralelně. Porce s předpokládanými cystami jsou přeneseny do čisté zkumavky a opakovaně, zpravidla třikrát promyty PBS a poté odstředěním koncentrovány do malého objemu roztoku. Po mikroskopické kontrole je provedena izolace DNA a PCR k rozlišení patogenní a nepatogenní formy améby v laboratořích molekulárně biologických metod Ústavu klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN v Hradci Králové (obr. 1).



Obr. 1./Fig. 1.

**Průkaz DNA *E. histolytica*/*E. dispar* metodou PCR.**  
1: pozitivní vzorek z cyst *E. dispar* ze stolice pacienta; H+ pozitivní kontrola *E. histolytica*, D+ pozitivní kontrola *E. dispar*; zcela vpravo negativní kontrola (destilovaná voda).  
Proof of DNA of *E. histolytica*/*E. dispar* by means of PCR.

1: positive stool sample with cysts *E. dispar* from a patient; H+ positive control *E. histolytica*; D+ positive control *E. dispar*; negative control (distilled water) on the right.

## SÉROLOGICKÉ METODY

Sérologické metody k průkazu protilátek proti *Entamoeba histolytica* jsou významné při podezření na extraintestinální formu onemocnění – amébový absces. Absces je vytvářen v infikovaném orgánu několik týdnů až měsíců, během nichž dochází k rozvoji klinických příznaků. Améby již ve stolici zpravidla nejsou přítomny a organizmus hostitele má dost času na vytvoření specifických protilátek [3]. Při podezření na tuto formu onemocnění je proto velmi výhodné ihned odeslat krevní sérum pacienta do specializované laboratoře na vyšetření protilátek (používány jsou EIA testy, hemaglutinačně inhibiční test apod.). V případě, že je nutné provést drenáž abscesu (po zvažení a nejlépe pod clovou Metronidazolu), je velmi vhodným materiálem pro vyšetření metodou PCR obsah abscesu, stačí detritus vytékající z drénu [7]. V tomto typu biologického materiálu nenalezneme améby (!), ale je v něm velké množství DNA z uhynulých a rozpadajících se améb. Améby v podobě agresivních velkých trofozoitů se vyskytují v abscesové dutině vždy na pomezí zdravé tkáně, a proto je v buněčném detritu nenalezneme a vyšetření materiálu barvicí technikou je de facto zbytečné a může být zavádějící (falešně negativní výsledek). Vzhledem ke

skutečnosti, že extraintestinální amébový absces je způsoben vždy pouze *E. histolytica*, stačí k průkazu původce pouze PCR cíleně zaměřená na patogenní amébu.

## ZÁVĚR

Patogenní améba *E. histolytica* je původcem několika forem intestinálního a extraintestinálního onemocnění a této skutečnosti je nutné přizpůsobit odběr vzorků klinického materiálu k laboratornímu vyšetření.

**1. Při podezření na střevní infekci** odbíráme po domluvě s parazitologem **průjmovitou stolicí** a doručíme ji bez vychladnutí ihned do laboratoře (1–2 hod po defekaci). **Stolici formovanou** k průkazu cyst zašleme do laboratoře do 24–48 hod po defekaci a dočasně ji můžeme uložit při chladničkové teplotě (vzorek nesmí zmraznout). Dodržujeme zásadu odběru min. tří vzorků (s odstupem 24 hod). Za 3–4 týdny po ukončení terapie pozitivního pacienta provedeme stejným způsobem kontrolní parazitologické vyšetření [6]. V Ústavu klinické mikrobiologie LF UK a FN Hradec Králové je v případě nálezu cyst suspektních pro *E. histolytica* vzorek zpracován (koncentrace a promytí cyst) a předán k PCR diagnostice do laboratoří Ústavu klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN Hradec Králové.

**2. Při podezření na extraintestinální formu onemocnění (amébový absces) zašleme:**

- krevní sérum na specializované pracoviště (v České republice: Národní referenční laboratoř pro laboratorní diagnostiku tropických parazitárních infekcí, Studničkova 7, 128 00 Praha 2, RNDr. Eva Nohýnková, Ph.D., telefon 224 968 525; e-mail enohy@lf1.cuni.cz) k vyšetření na přítomnost protilátek proti *E. histolytica*
- v případě, že je k dispozici obsah dutiny abscesu, zašleme jeho vzorek do Ústavu klinické biochemie

a diagnostiky LF UK a FN Hradec Králové, laboratoře molekulárních biologických metod, k vyšetření na přítomnost DNA patogenního prvoka *E. histolytica*.

## Literatura

1. Ackers JP. The diagnostic implications of the separation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. J Biosci 2002; 27 (Suppl 3): 573–578.
2. Delialioglu N, Aslan G, Sozen M et al. Detection of *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* in stool specimens by using enzyme-linked immunosorbent assay. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99(7): 769–772.
3. DiMiceli L. Distinguishing between pathogenic and non-pathogenic species of *Entamoeba*. Lab Med 2004; 35(10): 613–616.
4. Khairnar K, Parija SC, Palaniappan R. Diagnosis of intestinal amoebiasis by using nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. J Gastroenterol 2007; 42(8): 631–640.
5. Myjak P, Kur J, Pietkiewicz H et al. Molecular differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from stool and culture samples obtained from Polish citizen infected in tropics and in Poland. Acta Protozool 2000; 39: 217–224.
6. Nohýnková E, Stejskal F. Améboza. Sanquis 2003; 5(29): 20–24.
7. Verweij JJ, Blotkamp J, Brienens EAT et al. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* cysts using polymerase chain reaction on DNA isolated from faeces with spin columns. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19(5): 358–361.

Adresa pro korespondenci/

Correspondence to:

MVDr. Zuzana Čermáková, Ph.D.

Ústav klinické mikrobiologie

LF UK a FN Hradec Králové

Sokolská 581

500 05 Hradec Králové

e-mail: cermakovaz@fnhk.cz