

DIŞKI ÖRNEKLERİNDE GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE *ENTAMOEB*A *HISTOLYTICA* SAPTANMASINDA DUYARLI BİR DNA SAFLAŞTIRMA PROTOKOLÜ UYARLANMASI*

ADAPTATION OF A SENSITIVE DNA EXTRACTION METHOD FOR DETECTION OF *ENTAMOEB*A *HISTOLYTICA* BY REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

Ahmet PINAR¹, Yakut AKYÖN¹, Alpaslan ALP¹, Sibel ERGÜVEN¹

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. (apinar@hacettepe.edu.tr).

ÖZET

Bu çalışmada, tüm dünyada önemli morbidite ve mortaliteye neden olan *Entamoeba histolytica*'nın dışkı örneklerinden tanısında kullanılan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için duyarlı bir DNA saflaştırma protokolü uyarlanması amaçlanmıştır. Dışkı örneklerinden nükleik asit saflaştırılması, PCR yönteminde sorun yaratan ve PCR duyarlılığını doğrudan etkileyen bir basamaktır. Çalışmamızda, *E. histolytica* saptanmasında gerçek zamanlı PCR duyarlılığının artırılması için, "QIAamp DNA stool minikit (Qiagen, Almanya)" protokolü uyarlanarak, bir gece boyunca proteinaz K ve sodyum dodesil sülfat (SDS) inkübasyonu eklenmiştir. Üç farklı DNA saflaştırma protokolünün [(1) özgün yöntem, (2) setiltrimetil amonyum bromür (CTAB) yöntemi, (3) uyarlanmış yöntem] duyarlılık üzerine etkinlikleri gerçek zamanlı kantitatif PCR sisteminde (Artus RealArt™ *E. histolytica* RG PCR Kit, Qiagen Diagnostics, Almanya) saptanmıştır. Bu amaçla, saflaştırma öncesinde parazit bulunmadığı bilinen dışkı örneklerine farklı sulandırılmalarda standart *E. histolytica* DNA'sı karıştırılmış ve saflaştırma yöntemleri ayrı ayrı uygulanmıştır. "QIAamp DNA stool minikit" uygulamasıyla saptama duyarlılığı 5000 kopya/ml, CTAB yöntemiyle saptama duyarlılığı 500 kopya/ml bulunmuştur. Uyarlanmış "QIAamp DNA stool minikit" uygulamasıyla ise saptama duyarlılığı 5 kopya/ml'ye yükseltilmiştir. PCR duyarlılığını doğrudan etkileyen dışkıdan nükleik asit saflaştırma protokollerinin saptama duyarlılıkları, PCR ile saptanacak her mikroorganizma için değerlendirilmelidir.

Anahtar sözcükler: *Entamoeba histolytica*, gerçek zamanlı PCR, dışkı örneği, DNA saflaştırma.

* Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından 05.01.101.002 no'lu araştırma projesi ön çalışması kapsamında desteklenmiştir.

ABSTRACT

This study was aimed to adapt a sensitive DNA extraction protocol in stool samples for real-time polymerase chain reaction (PCR) detection of *Entamoeba histolytica* which causes important morbidity and mortality worldwide. Stool extraction is a problematic step and has direct effects on PCR sensitivity. In order to improve the sensitivity of *E.histolytica* detection by real-time PCR, "QIAamp DNA stool minikit (Qiagen, Germany)" was modified by adding an overnight incubation step with proteinase K and sodium dodecyl sulfate (SDS) in this study. Three different extraction methods [(1) original method, (2) cetyltrimethyl-ammonium bromide (CTAB) method, (3) modified method] were evaluated for effects on sensitivity in real-time quantitative PCR (Artus RealArt™ *E.histolytica* RG PCR Kit, Qiagen Diagnostics, Germany). For this purpose, several concentrations of standard *E.histolytica* DNA were spiked in parasite-free stool samples and three different extraction protocols were performed. Detection sensitivities of "QIAamp DNA stool minikit" was found 5000 copies/ml and of CTAB method was found 500 copies/ml. Detection sensitivity of the extraction was improved to 5 copies/mL by modified "QIAamp DNA stool minikit" protocol. Since detection sensitivities of nucleic acid extraction protocols from stool samples directly affect the sensitivity of PCR amplification, different extraction protocols for different microorganisms should be evaluated.

Key words: *Entamoeba histolytica*, real-time PCR, stool samples, DNA extraction.

GİRİŞ

Entamoeba histolytica, dünyanın büyük kısmında endemik olan bir bağırsak protozoonudur. Her yıl milyonlarca dizanteri ve karaciğer apsesi olgusuna neden olan bu protozoonun erken tanısı büyük önem taşımaktadır. İnvazif hastalığa neden olmadan önce, *E.histolytica* insan bağırsağında uzun süre asemptomatik enfeksiyon etkeni olarak yaşayabilmektedir. Parazitin bulaşını ve enfekte kişilerde invazif hastalık gelişmesini önleyebilmek amacıyla *E.histolytica* taşıyıcılarının tedavi edilmesi önerilmektedir¹.

E.histolytica'nın laboratuvar tanısında geleneksel olarak kullanılan yöntem, dışkı örneklerinin mikroskopik incelemesidir. Ancak *Entamoeba dispar* ve *Entamoeba moshkovskii*, hastalandırıcı özellikleri kesin olmayan *Entamoeba* türleridir ve *Entamoeba* türlerinin mikroskopik incelemede morfolojik olarak ayırt edilmeleri oldukça zor, hatta mümkün değildir. Bu nedenle, patojen olmayan türlerin bulunduğu hastaların gereksiz yere tedavi almalarını önleyebilmek için, *E.histolytica*'yı özgül olarak saptayabilen laboratuvar yöntemlerine gereksinim doğmuştur. Bu amaçla üzerinde durulmakta olan en umut verici yaklaşım moleküler saptama yöntemleridir. Nükleik asit saptama yöntemlerinden polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve gerçek zamanlı PCR yöntemleri klinik örneklerden *E.histolytica* özgül tanısında ümit verici yaklaşımlar olarak görünmektedir².

Nükleik asit saptama yöntemlerinde analitik duyarlılık oldukça yüksek olmakla birlikte, özellikle klinik örnekten nükleik asit saflaştırma yöntemlerine bağlı olarak yöntem duyarlılığı düşebilmektedir. Ayrıca, *E.histolytica*'nın saptanacağı klinik örnek genellikle dışkı örneğidir. Moleküler tanı için en sorunlu örnek türü olan dışkı örnekleri, inhibitörler ve nükleik asit içeriği yönünden zengindir. Dışkı örneğinden *E.histolytica* saptanırken seçile-

cek nükleik asit saflaştırma yönteminin duyarlılığı, daha sonra kullanılacak nükleik asit saptama yönteminin duyarlılığını da etkilemektedir².

Bu çalışmanın amacı dışkı örneklerinden duyarlılığı yüksek bir DNA saflaştırma protokolü geliştirmektir. Böylece dışkı örneklerinden yüksek duyarlılıkla ve özgüllükte *E.histolytica* saptanması mümkün olacaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Dışkı Örnekleri

Çalışmada Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Parazitoloji Laboratuvarına parazit araştırılması amacıyla gönderilen ve parazit saptanmayan taze dışkı örnekleri kullanıldı. Örneklerden 80-100 mg alınarak steril distile su ile sulandırıldı ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

E.histolytica DNA'sı ve Dışkı Örneklerinin Hazırlanması

Standart *E.histolytica* DNA'sı "London School of Hygiene & Tropical Medicine (University of London), Department of Infectious and Tropical Diseases"den sağlandı. LYI-S-2 besiyerine %15 ABS eklenerek aksenik olarak üretilmiş *E.histolytica* HM-1: IMSS suşuna ait DNA, liyofilize halde laboratuvarımıza ulaştırıldı. Standart DNA örneği, steril distile su ile mililitrede 5×10^6 kopya olacak şekilde sulandırıldı ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

Standart *E.histolytica* DNA'sının steril distile su ile 1/10 seri sulandırımları yapılarak ml'de 5×10^6 'dan 5×10^1 kopyaya kadar farklı derişimlerde standart DNA'lar elde edildi. Farklı derişimlerde sulandırılmış bu standart DNA'lar 180 µl dışkı süspansiyonuna 20 µl olacak şekilde eklendi ve vorteks ile iyice karıştırıldı. Her çalışmaya, sulandırımlar yanında hiç DNA katılmayan negatif kontrol örnekleri de alındı. Örnekler DNA saflaştırmasına alınmadan önce internal kontroller eklendi.

DNA Saflaştırma Protokolleri

Çalışmada, aşağıda ayrıntıları verilen üç farklı DNA saflaştırma protokolü kullanıldı:

1. "QIAamp DNA stool minikit": Yöntem, üretici firmanın (QIAGEN, Almanya) önerileri doğrultusunda uygulandı. Kısaca; 500 µl dışkı örneği, kit içeriğinde bulunan ASL tamponundan 1.4 ml ile karıştırılıp 5 dakika 70 derecede inkübe edildi. 10.000 rpm'de santrifüj edilip üstte kalan sıvı alındıktan sonra bir adet InhibitEX tableti (kit içeriği) eklenip iki kez santrifüj edildi. Üstte kalan 200 µl örneğe 1/10 oranında proteinaz K ve internal kontrol eklendikten sonra 200 µl AL tamponu (kit içeriği) ile 70°C'de 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra üzerine 200 µl saf etanol eklenip toplam 600 µl örnek spin kolona alındı. Tüpler 8000 rpm'de bir dakika santrifüj edildikten sonra alta geçen sıvılar atılarak ve her seferinde temiz tüpler kullanılmak suretiyle yıkama tamponları (AW1, AW2) ile üç kez yıkandı. Son aşamada spin kolonların üzerine elüsyon tamponu (AE) eklenerek 8000 rpm'de bir dakika santrifüj edildi ve alta toplanan sıvı gerçek zamanlı PCR'de kullanıldı.

2. Setiltrimetil amonyum bromür (CTAB): Yöntem daha önce tarif edildiği şekilde uygulandı³. Kısaca dışkı örnekleri 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip üstte kalan kısım atıldıktan sonra çökelti üzerine 500 µl TE tamponu, %10'luk SDS'den 30 µl ve 20 mg/ml proteinaz K'dan 3 µl eklendi. Karışım 37°C'de bir gece inkübe edildi. Daha sonra 5 M NaCl'den 100 µl ve CTAB/NaCl çözeltisinden 80 µl eklenerek 65°C'de 10 dakika inkübe edildi. Inkübasyondan sonra eşit hacimde kloroform eklendi ve 5 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Sıvı kısım temiz bir tüpe alınarak kloroform: izoamil alkol (24:1) eklenerek beş dakika oda sıcaklığında 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Yine sıvı kısım temiz tüpe alınarak izopropanol ile %60 oranında karıştırılarak santrifügasyon sonucunda çökelti %70'lik etanol ile yıkanıp, kurutulduktan sonra TE tamponu ile sulandırılarak kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

3. Modifiye "QIAamp DNA stool minikit": Dışkı örneklerinin bol miktarda protein ve nükleik asit içermesi nedeniyle CTAB yönteminde kullanılan proteinaz K ve SDS basamaklarının, özgün "QIAamp DNA stool minikit" protokolüne eklenmesinin duyarlılığı artıracığı düşünüldü. Bu amaçla dışkı örnekleri 10.000 rpm'de santrifüj edilip üst kısım atıldıktan sonra 500 µl TE tamponu ile sulandırıldı ve üzerine %10 SDS ve 20 mg/ml proteinaz K eklendi. Bu karışım gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. Ertesi gün karışım vortexlenerek 500 µl'si temiz bir tüpe alınıp "QIAamp DNA stool minikit" protokolüne göre saflaştırıldı.

Gerçek Zamanlı Kantitatif *E.histolytica* PCR

Çalışmada, dışkı örneklerinde kantitatif olarak *E.histolytica* saptamak amacıyla Artus RealArt™ *E.histolytica* RG PCR Kit (Qiagen Diagnostics, Almanya) kullanıldı. *E.histolytica* genomuna özgül 230 baz çifti (bç) uzunluğunda bir bölgenin çoğaltıldığı sistemde, bütün işlemler üretici firma önerilerine göre yapıldı. Amplifikasyon işleminde Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research, Almanya) cihazı kullanıldı. Internal kontrol kanalında pozitif sonuç alınamayan örnekler değerlendirme dışında tutuldu. Kit içeriğinde bulunan kantitasyon standartlarına göre üretici firmanın önerileri doğrultusunda hesaplamalar yapılarak sonuçlar kopya/ml şeklinde saptandı.

BULGULAR

Üç farklı günde tekrarlanan deneyler sonucunda "QIAamp DNA stool minikit" protokolü uygulandığında saptanabilen en düşük *E.histolytica* DNA miktarı 5000 kopya/ml olarak bulunmuştur. Duyarlılığın düşük olması nedeniyle CTAB protokolü denenmiş ve yine üç farklı günde tekrarlanan deneyler sonucunda saptanabilen en düşük *E.histolytica* DNA miktarı bu kez 500 kopya/ml bulunmuştur. Duyarlılığın daha da artırılması amacıyla, "QIAamp DNA stool minikit" saflaştırma protokolü modifiye edilerek uygulanmış ve üç ayrı günde tekrarlanan deneyler sonucunda saptanabilen en düşük *E.histolytica* DNA miktarının 5 kopya/ml olduğu izlenmiştir (Tablo I).

Tablo 1. Üç Farklı DNA Saflaştırma Protokolü ile Elde Edilen *E.histolytica* Gerçek Zamanlı PCR Kantitasyon Sonuçları

Örneklerde bulunan DNA miktarı (kopya/ml)	Saptanan DNA miktarı (kopya/ml)		
	"QIAamp DNA stoolminikit"	CTAB	Modifiye "QIAamp DNA stool minikit"
5.000.000	5.306.668	4.865.633	5.643.128
500.000	446.975	419.162	448.042
50.000	52.335	77.204	43.313
5000	5035	3969	5707
500	Negatif	1261	752
50	Negatif	Negatif	68
5	Negatif	Negatif	11
Negatif kontrol	Negatif	Negatif	Negatif

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

TARTIŞMA

E.histolytica, tüm dünyada parazitlerin neden olduğu mortalite etkenlerinin üçüncü sırasında gelmektedir^{1,4,5}. Her yıl yaklaşık 50 milyon kişide invazif amibiyoze gelişmekte ve sonuçta 100.000 ölüm görülmektedir. *E.histolytica* laboratuvar tanısı için en yaygın kullanılan yöntem mikroskopidir. Mikroskopi yöntemi, ıslak preparat, konsantrasyon ve boyama yaklaşımlarını içerir. Islak preparat incelemelerinin duyarlılığının %10'dan düşük olduğu belirtilmektedir⁶. Konsantrasyon ve trikrom gibi boyama yaklaşımları yanında üç gün ardı ardına alınan dışkı örneklerinin incelenmesi gibi yaklaşımlarla mikroskopi duyarlılığı %85-95 aralığına yükseltilebilmektedir⁷. Ancak *E.dispar* gibi patojen olmadığı düşünülen türlerin mikroskopide *E.histolytica* ile ayrımı mümkün olmadığından özgüllük düşük kalmaya devam etmektedir.

E.histolytica tanısında bir diğer yaklaşım ise dışkı örneklerinden antijen saptayan ELISA testleridir. Literatürde ELISA testleriyle elde edilen sonuçlar arasında uyumsuzluklar görülmektedir. Örneğin; bir çalışmada TechLab *E.histolytica* II (Blacksburg, Virginia) kiti ile duyarlılık %86-95 aralığında bulunurken, diğer bir çalışmada %14.3 gibi düşük bir oran saptanabilmektedir^{8,9}. Ayrıca, ELISA testlerinin *E.dispar* ile çapraz sonuçlar verdiği bildirilmiş olduğundan özgüllükleri de sorgulanmaktadır^{10,11}.

Yukarıda sıralanan sorunlar nedeniyle son yıllarda *E.histolytica* tanısında PCR temelli birçok yöntem tanımlanmış ve kullanıma girmiştir. Bazı yöntemlerin duyarlılığının en iyi ELISA kitlerinden 100 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir^{12,13}. Son olarak geliştirilen gerçek zamanlı PCR yaklaşımlarının, konvansiyonel PCR yaklaşımlarına göre bazı avantajları bulunmaktadır. Bunlar, PCR sonrası ayrı analiz aşamasının ortadan kalkması, daha hızlı tanı sağlanması, kontaminasyon riskinin azalması ve daha sağlıklı kantitasyona izin vermesi olarak sıralanabilir¹⁴. Ayrıca, gerçek zamanlı PCR yönteminin analitik duyarlılığı konvansiyonel PCR'ye göre daha yüksektir¹⁵.

E.histolytica tanısında PCR yöntemlerinin en büyük dezavantajı dışkı örneklerinden çalışılmasıdır. İçerdiği bilirubin, hem safra tuzları gibi inhibitörler ve kompleks karbonhidratlar nedeniyle dışkı örnekleri PCR çalışılması için en zor örnekler sınıfına girmektedir¹⁶. Dolayısıyla dışkı örneklerinden DNA saflaştırılması yöntemlerinin optimizasyonu, PCR yöntemlerinin başarısı için büyük önem taşımaktadır. İlk önceleri çok zaman alıcı ve emek-yoğun “manuel” yöntemlerin kullanılması gündemdeyken, sonraları daha kısa ve az zahmetli hazır kitler üretilmiştir. Bu kitler arasında “QIAamp DNA stool minikit” (Qiagen, Almanya), dışkıdan DNA saflaştırılması amacıyla en kabul gören yöntem olmuştur¹⁷. McOrist ve arkadaşlarının¹⁸ 2002 yılında yayınlanan çalışmasında, farklı DNA saflaştırma yöntemleri karşılaştırılmış ve dışkıdan bakteri DNA’sının elde edilmesinde en verimli yöntemin “QIAamp DNA stool minikit” olduğu bildirilmiştir. Ancak bakterilerden DNA eldesini konu alan bu çalışmanın sonuçları, dayanıklı kistlerin de parçalanması gereken *E.histolytica* tanısı için aynı geçerlilikte olmayabilir. Nitekim *E.histolytica* tanısında trikrom boyama, ELISA ve gerçek zamanlı PCR yöntemlerinin karşılaştırılması amacıyla planladığımız çalışmada, çoğu örnek mikroskopi ya da ELISA yöntemleriyle pozitif bulunmasına rağmen gerçek zamanlı PCR sonuçları negatif bulunmuş ve bu ön çalışmanın yapılması gerekmiştir. Analitik duyarlılığı 1 kopya/ml olan gerçek zamanlı PCR testinde “QIAamp DNA stool minikit” ile ancak 5000 kopya/ml saptanabilmiştir. Kompleks karbonhidratların uzaklaştırılmasında oldukça etkili bir yöntem olan CTAB kullanıldığında duyarlılık 500 kopya/ml olarak saptanmıştır. Duyarlılığın daha da yükseltilmesi için “QIAamp DNA stool minikit” protokolüne bir gece boyunca proteinaz K + SDS inkübasyonu eklenmiş ve böylece duyarlılığın 5 kopya/ml’ye ulaşması başarılmıştır. Dışkıdan bakteri DNA’sı saflaştırılmasında oldukça başarılı olan “QIAamp DNA stool minikit”, *E.histolytica* için aynı başarıyı ancak bu modifikasyon ile gösterebilmiştir. Bunun nedeninin, dışkıda bulunan *E.histolytica* kistlerinin parçalanabilmesi için uzun süreli kimyasal parçalama gereksinimi olduğu düşünülmüştür. Ariefdjohan ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yayınlanan çalışmada, dışkıdan dirençli duvara sahip organizmaların DNA’larının saflaştırılmasında, fiziksel parçalama yöntemlerinin de kullanılması gerektiği belirtilmektedir¹⁹. Çalışmamızın bulgularına göre, uzun inkübasyonlu kimyasal parçalama yöntemlerinin de yaklaşık aynı sonucu verdiği görülmüştür.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), gelişmiş ülkelerde *E.histolytica* tanısında mikroskopi yanında PCR temelli yöntemleri önermektedir². Ancak PCR yöntemlerinin etkinliği, DNA saflaştırma etkinliğine doğrudan bağlıdır. Bu etkinliğin saptanması için gerçek zamanlı PCR gibi sağlıklı kantitasyon yapan sistemler kullanılmalıdır. Sonuç olarak bu çalışma ile, dışkıda *E.histolytica* DNA’sının saptanması için duyarlı bir saflaştırma protokolü modifiye edilerek uygulanmış ve saptama duyarlılığı 5000 kopya/ml’den 5 kopya/ml’ye yükseltilmiştir. Bu durum, özellikle dışkı örneklerinden çalışılan PCR yöntemlerinde, saptanması istenen her organizmaya özgül protokollerin geliştirilmesinin gerekliliğini vurgulamaktadır.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. World Health Organization/Pan American Health Organization/UNESCO report of a consultation of experts on amoebiasis. Wkly Epidemiol Rec 1997; 72: 97-9.
2. Fotadar R, Stark D, Bebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. Clin Microbiol Rev 2007; 20: 511-32.
3. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria, p: 2.4.1. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE (eds), Current Protocols in Molecular Biology. 1987, Wiley Co, New York.
4. Haque R, Huston CD, Hughes M, Hout E, Petri Jr WA. Current concepts: amebiasis. N Engl J Med 2003; 348: 1565-73.
5. Haque R, Petri Jr WA. Diagnosis of amebiasis in Bangladesh. Arch Med Res 2006; 37: 273-6.
6. Huston CD, Haque R, Petri Jr WA. Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. Expert Rev Mol Med 1999; 22: 1-11.
7. Li E, Stanley Jr SL. Protozoa, Amebiasis. Gastroenterol Clin N Am 1996; 25: 471-92.
8. Haque R, Faruque ASG, Hahn P, Lyster D, Petri Jr WA. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. J Infect Dis 1997; 175: 734-6.
9. Gatti S, Swierczynski G, Robinson F, et al. Amebic infections due to the *Entamoeba histolytica*-*Entamoeba dispar* complex: a study of the incidence in a remote rural area of Ecuador. Am J Trop Med Hyg 2002; 67: 123-7.
10. Furrows SJ, Moody AH, Chiodini PL. Comparison of PCR and antigen detection methods for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. J Clin Pathol 2004; 57: 264-6.
11. Visser LG, Verweij JJ, Van Esbroeck M, Edeling WM, Clerinx J, Polderman AM. Diagnostic methods for differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in carriers: performance and clinical implications in a non-endemic setting. Int J Microbiol 2006; 296: 397-403.
12. Mirelman D, Nuchamowitz Y, Stolarsky T. Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. J Clin Microbiol 1997; 35: 2405-7.
13. Trol H, Marti H, Weiss N. Simple differential detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fresh stool specimens by sodium acetate-acetic acid-formalin concentration and PCR. J Clin Microbiol 1997; 35: 1701-5.
14. Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. Trends Mol Med 2002; 8: 257-60.
15. Blessmann J, Buss H, Nu PA, et al. Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. J Clin Microbiol 2002; 40: 4413-7.
16. Holland JL, Louie L, Simor E, Louie M. PCR detection of *Escherichia coli* 5O157: H7 directly from stools: evaluation of commercial extraction methods for purifying fecal DNA. J Clin Microbiol 2000; 38: 4108-13.
17. Ramos F, Zurabian R, Moran P, et al. The effect of formalin fixation on the polymerase chain reaction characterization of *Entamoeba histolytica*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1999; 93: 335-6.
18. McOrist AL, Jackson M, Bird AR. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. J Microbiol Methods 2002; 50: 131-9.
19. Ariefdjohan MW, Savaiano DA, Nakatsu CH. Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens. Nutrition J 2010; 9: 23.