



Slovensko združenje
za klinično kemijo
in laboratorijsko
medicino

PRIPOROČENI POSTOPKI ZA LABORATORIJSKE PREISKAVE BLATA

3
II. izdaja
2017

Ivica Avberšek Lužnik

Ta priporočila izdaja in priporoča Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (SZKKLM). Priporočila so v skladu s predpisi Republike Slovenije, priporočili Mednarodnega združenja za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (IFCC-International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine).

Uredniški odbor: Saša Bratož (predsednica)
Pika Meško Brguljan
Evgenija Homšak

PRIPOROČENI POSTOPKI ZA LABORATORIJSKE PREISKAVE BLATA

Priprava: Ivica Ayberšek Lužnik

Zbirka: Priporočeni postopki, številka 3, II. izdaja

Izdalo: Slovensko združenje za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (SZKKLM)

Recenzent: Elizabeta Božnar Alič

Lektorica: Darja Homšak

Tisk: Demago d. o. o.

Naklada: 500

Predstavitev priporočenih postopkov za delo v klinično kemijskih laboratorijih Republike Slovenije ima namen, da se z obvezno uporabo le-teh doseže visoka stopnja kakovosti dela, upoštevajoč sistematizacijo dela, pribora in prostorov.

Priporočeni postopki za laboratorijske preiskave blata so namenjeni vsem sodelavcem v klinično kemijskih laboratorijih, zdravstvenim delavcem ter študentom in učencem zdravstvenih šol.

Priporočila je pregledal in odobril Razširjeni strokovni kolegij za laboratorijsko diagnostiko pri Ministrstvu za zdravje Republike Slovenije in se uporablja za delo v vseh medicinskih laboratorijih ter pri ostalih izvajalcih laboratorijske medicine, ki niso organizirani kot laboratoriji in za izvajanje preiskav ob preiskovancu (pacientu) – POCT.

Ljubljana, 4. 11. 2016

PRIPOROČENI POSTOPKI ZA LABORATORIJSKE PREISKAVE BLATA

doc. dr. Ivica Avberšek-Lužnik

Beseda recenzenta

Osnovni namen preiskav, ki se v medicinskih laboratorijih izvajajo v vzorcih blata, je ugotavljanje sprememb v gastrointestinalnem traktu. Te spremembe so lahko povezane z okužbami, vnetji, slabo absorpcijo oziroma prebavo hrane in rakastimi obolenji.

Odvzem vzorca blata je neinvaziven postopek, ki ga v večini primerov izvede pacient sam. Pri tem je izredno pomembna vloga medicinskega laboratorija: pripraviti mora ustrezna navodila in jih posredovati pacientom. Ustrezna navodila so osnovni pogoj za pravilno odvzet, hranjen in transportiran vzorec. Vse to zmanjšuje vpliv predanalitičnih napak in znatno prispeva k zanesljivosti rezultatov analiz.

Vzorec blata je bil v laboratorijski medicini kar nekaj let zapostavljen preiskovani biološki material. Večinoma so se izvajale analize, ki se v medicinskih laboratorijih izvajajo že dolga leta: prebavljivost, skrita kri v blatu, paraziti v blatu ... Potreba po povečanju nabora preiskav se je pokazala z novimi načini zdravljenja, saj se je hkrati pojavila tudi zahteva po enostavnem spremljanju učinkovitosti tega zdravljenja. Zaradi nestandardiziranih postopkov izvedbe se je število določenih preiskav zmanjšalo oziroma se vse bolj opuščajo (npr. maščobe v blatu, žolčna barvila).

Z vpeljavo nacionalnega presejalnega programa za odkrivanje kolorektalnega raka so preiskave za določanje skrite krvi (hemoglobina) v blatu pridobile

pomen. Hkrati so se na tem področju laboratorijske diagnostike razvile nove metode, ki omogočajo tudi kvantitativno določanje hemoglobina v blatu. V sklopu teh metod je bila uvedena tudi notranja kontrola kakovosti, ki je bistveno pripomogla h kakovosti in zanesljivosti rezultatov na tem področju, česar prejšnje metode niso omogočale.

Ugotavljanje okužbe z bakterijo *Helicobacter pylori* (HP) poteka z invazivnim endoskopskim postopkom, odvzemom tkiva za biopsijo in izvedbo ureaznega hitrega testa. Za kontrolo eradikacije okužbe se je pogostnost invazivnih preiskav že pred leti zmanjšala zaradi izvajanja dihalnih testov. Novejša preiskava na tem področju je določanje antigena HP v blatu, za katerega je bila dokazana visoka korelacija z dihalnim testom. V prihodnje bo ta preiskava gotovo prispevala k večji in lažji dostopnosti do ustrezne diagnostike in spremljanju uspešnosti eradikacijske terapije, uporabna pa bo tudi za namene epidemioloških raziskav.

Določanje beljakovine kalprotektina v blatu se je izkazalo kot zelo ustrezen posredni pokazatelj vnetnih procesov v gastrointestinalnem traktu. V diagnostiki kroničnih vnetnih črevesnih bolezni (KVČB) je fekalni kalprotektin učinkovit pokazatelj za razlikovanje med organskimi in funkcionalnimi boleznimi črevesa. Zaradi visoke negativne napovedne vrednosti je zelo primeren presejalni test za izključitev KVČB. Z uvedbo individualno prilagojene terapije za zdravljenje KVČB z bi-

ološkimi zdravili se je povečala potreba po neinvazivnih postopkih, s katerimi lahko spremljamo učinkovitost zdravljenja oziroma aktivnost bolezni pri teh pacientih.

Prenovljena priporočila upoštevajo novosti in spremembe, ki so se pokazale v

zadnjih letih na tem področju laboratorijske diagnostike, zato bodo uporaben in koristen priročnik za vse laboratorije, ki izvajajo tovrstne preiskave.

Mag. Elizabeta Božnar Alič,
spec. med. biokem.

KAZALO

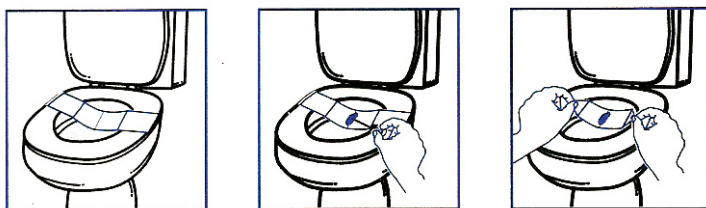
1. UVOD	7
1. 1. Sestava, odvzem in konzerviranje blata	7
2. MAKROSKOPSKI PREGLED BLATA	8
3. MIKROSKOPSKI PREGLED BLATA	9
3. 1. Pregled nativnega vzorca blata	9
3. 2. Pregled blata za ugotovitev prebavljivosti	10
3.2.1 Mišična vlakna v blatu	11
3.2.2 Škrob v blatu	11
3.2.3 Maščobe v blatu	12
3. 3. Pregled blata za ugotovitev prisotnosti levkocitov	13
4. KEMIJSKE ANALIZE BLATA	13
4. 1. pH blata	14
4. 2. APT-test	14
4. 3. Žolčna barvila v blatu	14
4. 4. Okultna kri v blatu	15
4. 5. Maščobe v blatu kvantitativno	17
4. 6. Tripsin in kimotripsin v blatu	18
4. 7. Pankreatična elastaza v blatu	19
4. 8. Kalprotektin v blatu	20
4. 9. Antigen bakterije <i>helicobacter pylori</i> v blatu	22
5. PARAZITI V BLATU	24
5. 1. Priprava in pregled nativnega vzorca blata	25
5. 2. Priprava in pregled koncentriranega vzorca blata	25
5.2.1 Postopek naplavljanja (flotacije)	25
5.2.2 Postopek sedimentacije	26
5. 3. Pregled perianalnega brisa	27
5. 4. Medicinsko pomembni zajedavci tankega in debelega črevesa	27
6. LITERATURA	29

1. UVOD

Blato je končni produkt presnove. Z njim se iz telesa izločajo voda, neprebavljene in neabsorbirane sestavine hrane in izločki prebavnega trakta. Ker so bolezni prebavnega trakta eden najpogostejših zdravstvenih problemov današnjega časa, je za uspešno in pravočasno zdravljenje pomembna pravilna diagnoza, ta pa je odvisna tudi od laboratorijske analize blata.

1. 1. Sestava, odvzem in konzerviranje blata

Blato sestavlja največ vode (60–80 %), preostali del (20–40 %) pa je suha snov. Dnevno izločimo 100 do 200 g blata. Normalen vzorec blata vsebuje: vodo, elektrolite, bakterije, celulozo, neprebavljene delce hrane, produkte črevesnega izločanja, žolčne pigmente (urobilinogen, sterkobilinogen) in njihove oksidacijske produkte, proste maščobne kisline, lipide in dušikove spojine. Za večino laboratorijskih analiz je primeren svež vzorec blata, konzerviranega se sme uporabiti le za nekatere preiskave. Laboratorijsko osebje mora preiskovancu dati natančna navodila (ustna in pisna), kako mora ravnati med vzorčenjem blata: kako odvzame vzorec blata, koliko ga odvzame in kolikokrat mora postopek ponoviti. Vzorec blata se najbolj enostavno odvzame tako, da se preiskovanec iztrebi v čisto posodo ali v plastično vrečko, ki jo namesti v straniščno školjko; slednje je mnogo lažje izvedljivo (slika 1).



Slika 1: Shematski prikaz pravilnega postopka za vzorčenje blata

V laboratoriju odvezamemo za analizo tisti del vzorca, ki je sluzast, tekoč ali krvavkast. Preiskave blata za ugotovitev prebavljivosti in vsebnosti okultne krvi (hemoglobina) moramo opraviti najkasneje en dan po odvzemu. Če se vzorci shranijo v predpisane epruvete s pufrom, ki deluje kot stabilizator hemoglobina, so stabilni do 7 dni na sobni temperaturi in do 14 dni pri temperaturi 2–8 °C.

2. MAKROSKOPSKI PREGLED BLATA

Pri hospitaliziranih preiskovancih medicinska sestra zabeleži podatke o količini, barvi, obliki, vonju in konsistenci blata in številu iztrebljanj na dan.

V laboratoriju opravimo makroskopski pregled nekonzerviranega vzorca blata. Trofozoiti črevesnih zajedavcev propadejo hitro po iztrebljanju, zato je podatek o starosti vzorca zelo pomemben. Blato pregledamo glede na vsebnost sluzi (rumenkasta, steklasto prozorna), krvi, gnoja, maščob in parazitov oziroma njihovih delov.

Celotno dnevno količino blata moramo pregledati takrat, ko iščemo glavico trakulje. Odrivki trakulje niso vedno pripeti na glavico, zato jo je težje najti. Blato zmešamo z vodo v razmerju 1 : 5 in precedimo skozi gazo. Ostanek na gazi preiščemo s pinceto in izločimo glavico in odrivke. Speremo jih z destilirano vodo ter položimo med dve objektni stekelci in enakomerno stisnemo. Morfološke značilnosti odrivkov in glavice so jasno vidne.

Konsistenca blata. Blato je lahko tekoče, mehko ali čvrsto. Amebe in bičkarji so pogosto prisotni v vodenih izločkih. Na sobni temperaturi hitro propadejo. V mehkejših vzorcih lahko najdemo trofozoite in ciste, v čvrstih vzorcih pa samo ciste. Jajčeca in ličinke zajedavcev svojih značilnih morfoloških lastnosti ne izgubijo tako hitro kot trofozoiti.

Barva blata. Normalna je svetlo rjava barva, in to zaradi prisotnosti sterkobilinogena in urobilinogena. Peroralno aplicirani antibiotiki obarvajo blato rumenkasto, metilensko modrilo zelenomodro, kalomel zelenkasto, hematoksilin rdeče, preparati železa in bizmuta pa temno rjavo do črno. Pri krvavitvah iz požiralnika, želodca ali dvanajstnika je blato obarvano črno, pri krvavitvah iz nižjih predelov prebavne cevi pa opazimo rdečkasto barvo blata. Sivobela barva je značilna za steatorejo, zelena pa se pojavi po zaužitju zelenjave z mnogo klorofila, lahko pa pomeni tudi vsebnost biliverdina.

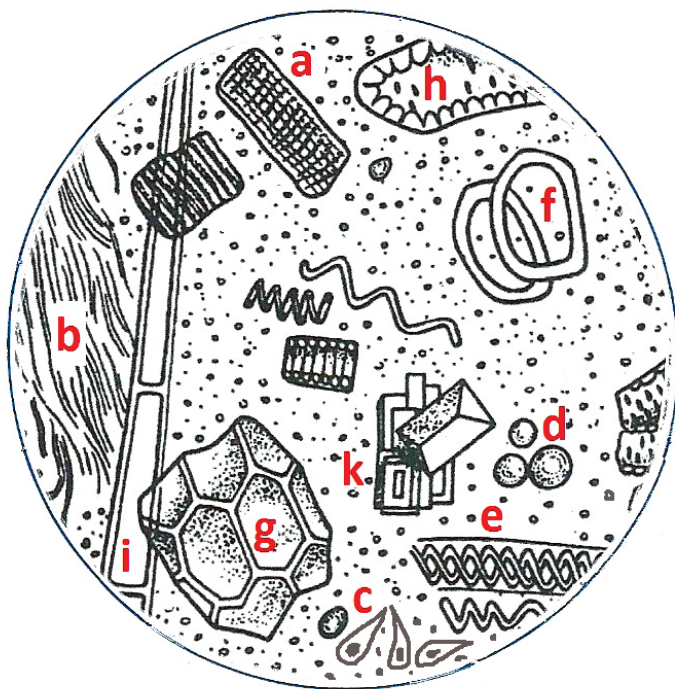
Vonj blata. Blato ima neprijeten vonj zaradi nastanka indola in skatola, ki sta produkta bakterijske razgradnje triptofana. Od plinov vsebuje H_2 , CO_2 , H_2S ter hlapne aminer in kislin.

3. MIKROSKOPSKI PREGLED BLATA

3. 1. Pregled nativnega vzorca blata

Vzorec blata razredčimo z destilirano vodo v razmerju 1 : 1 in dobro premešamo. Eno do dve kapljici suspenzije blata nanesemo na objektno stekelce, prekrijemo s krovnim stekelcem in pri 400-kratni povečavi pregledamo 15 vidnih polj, da v povprečju ocenimo sestavo vzorca.

V normalnem vzorcu blata vidimo: redke celulozne ovojnice, mišična vlakna s homogeno strukturo, maščobne kapljice (redke), redke rumenkaste grudice (mila), vezivno tkivo, redke epitelne celice, mikroorganizme, rastlinske celice in vlakna (slika 2).



Slika 2: Shematski prikaz normalnega vzorca blata: a) mišična vlakna, b) vezivno tkivo, c) epitelne celice, d) levkociti, e) rastlinska spiralna žila, f), g), h) različne rastlinske celice, i) rastlinsko vlakno, k) kristali fosfatov

3. 2. Pregled blata za ugotovitev prebavljenosti

Da dobimo podatke o absorpcijski sposobnosti črevesa, pregledamo blato, odvzeto tretji dan hranjenja po t. i. Schmidt-Strasburgerjevi dieti (dieta je opisana v Medicinski biokemiji Božidarja Strausa, v poglavju Pregled stolice). Po predpisani dieti zaužije testirana oseba zadostno količino beljakovin, ogljikovih hidratov in maščob, zato je vzorec blata primeren za mikroskopski pregled za ugotovitev prebavljenosti zaužite hrane. Pomembno je, da preiskovana oseba dosledno upošteva predpisano dieto. Ta dieta je taka:

- **zajtrk:** 0,5 L mleka, 50 g prepečenca ali 1 žemlja;
- **dopoldanska malica:** 0,5 L zdrobove juhe (40 g ovsenega zdroba, 10 g masla, 200 g mleka, 300 g vode, 1 jajce, sol);
- **kosilo:** 125 g sesekljanе puste govedine (pečene na 20 g masla, znotraj pa rahlo surove), 250 g pretlačenega krompirja (v 100 g mleka in 10 g masla);
- **popoldanska malica:** enako kot za kosilo;
- **večerja:** enako kot za dopoldansko malico.

Drugi dan je treba ponoviti celoten jedilnik.

Tretji dan zjutraj opravi preiskovanec odvzem vzorca blata na naslednji način:

- urinira v straniščno školjko;
- školjko obloži s papirjem;
- opravi iztrebljanje;
- pripravi posodico z žličko za blato; z žličko odvzame s treh različnih mest za lešnik veliko količino blata, žličko z blatom previdno vstavi v posodico z navojem, jo zapre in čim prej odnese v laboratorij.

3.2.1 Mišična vlakna v blatu

Eno do dve kapljici vodne suspenzije blata nanesimo na objektno stekelce, previdno pokrijemo s krovnim stekelcem in preparat pregledamo, da bi ugotovili prisotnost mišičnih vlaken. Pri normalni prebavi najdemo mišična vlakna v velikosti 0,5 cm × 0,8 cm rumenkasto obarvanih pravokotnikov s homogeno strukturo vzdolžnih in prečnih niti. Neprebavljena vlakna so večja in imajo nehomogeno strukturo. Rezultat preiskave podamo z oznako 0 ali 1 ali z besedama: beljakovine prebavljene oziroma neprebavljene.

3.2.2 Škrob v blatu

Eni do dvema kapljicama vodne suspenzije blata dodamo do dve kapljici Lugolove raztopine in mikroskopiramo po navodilih, navedenih v poglavju 3.1. Škrobna zrnca se obarvajo modro, vmesni produkti prebavljenega škroba (dekstrini) pa rožnato. Rezultat preiskave podamo z oznako 0 ali 1 ali z besedo: prebavljen oziroma neprebavljen.

Priprava Lugolove raztopine: 4 g kalijevega jodida raztopimo v malo tople destilirane vode, dodamo 2 g resublimiranega joda, in ko se ta popolnoma raztopi, dopolnimo z destilirano vodo do 100 mL.

3.2.3 Maščobe v blatu

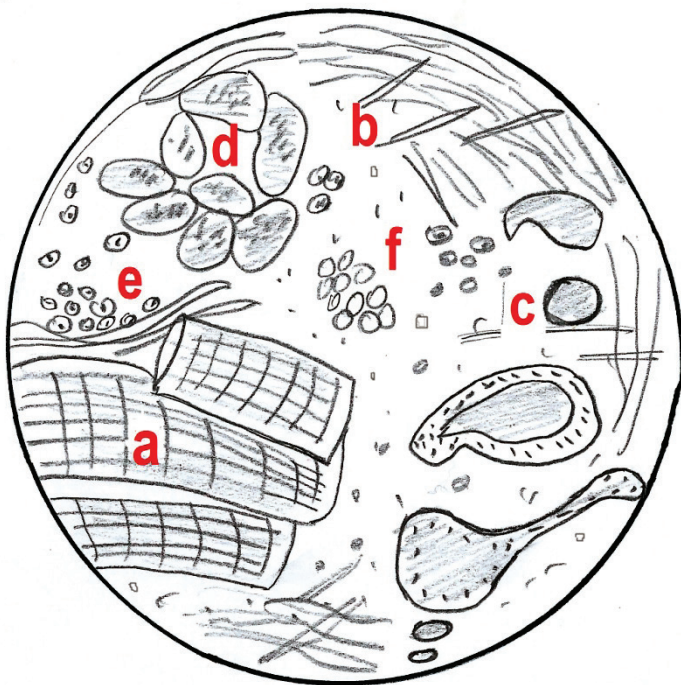
Eni do dvema kapljicama vodne suspenzije blata dodamo do dve kapljici raztopine sudana III ter mikroskopiramo po navodilih, navedenih v poglavju 3.1.

Lipidi obstajajo v blatu kot nevtralne maščobe ali mila. Samo nevtralne maščobe se barvajo direktno s sudanom III. Prisotne so kot velike oranžne kaplje na robu preparata. Če jih je pri 400-kratni povečavi več kot 60 na vidno polje, so indikator steatoreje, ki je nastala zaradi pomanjkanja encimov pankreasa.

Mila pretvorimo v maščobne kisline z raztopino 30-odstotne očetne kisline. Takšen preparat še rahlo segrejemo nad gorilnikom in mikroskopiramo. Kapljice s premerom več kot 75 μm so indikator steatoreje, ki je posledica malabsorpcije. Rezultat izrazimo z oznako 0 ali 1 ali z besedama: maščobe prebavljene oziroma neprebavljene.

Priprava raztopine sudan III: 0,2 g sudana III raztopimo v 10 mL koncentriranega etanola in dodamo 90 mL ledocetne kisline.

Patološko spremenjeni vzorec blata lahko vsebuje: velika mišična vlakna s prečno in vzdolžno potekajočimi progami, igličaste kristale maščobnih kislin in mil, ki imajo obliko rozet, kapljice nevtralnih maščob, škrobna zrnca in kvasovke (slika 3).



Slika 3: Shematski prikaz patološko spremenjenega vzorca blata: a) velika, neprebavljena mišična vlakna, b) kristali maščobnih kislin, c) nevtralne maščobne kapljice, d) neprebavljena škrobna zrna, e) bakterije, f) kvasovke.

3. 3. Pregled blata za ugotovitev prisotnosti levkocitov

Preparat obarvamo z metilenskim modrilom (ena do dve kapljici suspenzije blata in ena kapljica barvila) in mikroskopiramo. Če opazimo najmanj tri nevtrofilne granulocite na vidno polje pri 400-kratni povečavi, je driska posledica invazivnega procesa v črevesni steni. Nevtrofilnih granulocitov ni pri driskah, katerih povzročitelji so mikrobi, ki proizvajajo toksine.

4. KEMIJSKE ANALIZE BLATA

4. 1. pH blata

pH-reakcija blata je pri mešani prehrani nevtralna ($\text{pH} = 6,0\text{--}7,7$), kislja reakcija pa je značilna za driske, povzročene s črevesnimi bakterijami, ki porabljajo ogljikove hidrate.

Zmešamo 1 del blata in 2 dela destilirane vode in pH določimo s pH-indikatorskim trakom z območjem pH med 5 in 9 ali pa s pH-metrom.

4. 2. APT-test

Pri novorojenčkih se včasih pojavi močno krvavkasto blato ali izbljuvana masa. Pojav je lahko posledica zaužitja materine krvi med porodom. Metoda alkalne denaturacije (*alkali denaturation test* – APT-test) se uporablja za razlikovanje med maternalno in fetalno krvjo v blatu ali izbruhani masi novorojenčkov.

Blato emulzificiramo z 2 mL vode, da se sprosti hemoglobin, centrifugiramo in supernatantu dodamo 1 mL 1-odstotne vodne raztopine NaOH. Če supernatant vsebuje fetalni hemoglobin (rezistenten proti alkalnim raztopinam), ostane rožnate barve, rjavkasta barva pa je značilna za supernatant z materino krvjo v blatu ali v izbruhani masi novorojenčka.

4. 3. Žolčna barvila v blatu

Žolčna barvila, to so sterkobilin, sterkobilinogen in bilirubin, so razgradni produkti hemoglobina, ki se izločajo z blatom. Blatu dajejo značilno rjavo barvo. Pri jetrnih obolenjih in obstrukciji žolčevodov žolčna barvila v blatu niso prisotna.

1 g blata razredčimo z 20 mL vode, suspenzijo filtriramo, da odstranimo grobe delce, 3 dele raztopine zmešamo z 1 delom

nasičene raztopine sublimata (6 g sublimata raztopimo v 100 mL tople destilirane vode) in pustimo stati 60 minut pri 37 °C.

Pri normalnem vzorcu blata nastane malo oborine, tekočina nad oborino je motna in rahlo rdečkasta. Če vzorec vsebuje sterkbilin, se pojavi precej oborine, supernatant pa je bister in rdečkast. Če vzorec vsebuje bilirubin, je supernatant zelenkast, pri obstruktivnem ikterusu pa je brezbarven.

4. 4. Okultna kri v blatu

Uvod in namen določanja

Ugotavljanje okultne krvi (hemoglobina) v blatu je danes najpogostejše uporabljen presejalni postopek za odkrivanje bolezni prebavil. Uporaba ustreznih testov je zelo pomembna, ker se tako lahko odkrijejo rakasta obolenja črevesa v zgodnji fazi razvoja. Pozitiven presejalni test vodi v izvedbo specifičnih diagnostičnih testov (kolonoskopija), s katerimi lahko potrdimo rakasto obolenje črevesa. Vsaka izguba krvi, ki presega fiziološko izgubo, je posledica patoloških sprememb v črevesu, vendar ni nujno, da so količine hemoglobina pri bolnikih z rakom vedno nad to vrednostjo. Za določanje okultne krvi v blatu se priporoča izbira testa z ustrezno občutljivostjo. Kriterij za občutljivost je fiziološka izguba krvi. V laboratorijski praksi se uporabljajo tri vrste testov: presejalni nespecifični test (test z gvajakovo smolo), imunološki kvalitativni hitri testi in imunološki kvantitativni testi. Ne glede na vrsto testa se priporoča zbiranje **treh vzorcev blata** iz treh spontanih zaporednih iztrebljanj. Odvzem vzorca ni primeren v času menstruacije (vzorci se odvzamejo 3 dni po zaključenih menstruaciji), če ima preiskovanec drisko (vzorci odvzame, ko se mu uredi prebava) ali krvaveče hemoroide (vzorci odvzame, ko krvavitve nima več).

Presejalni nespecifični test z gvajakovo smolo

Test se izvaja na kartonski podlagi, ki je impregnirana z gvajakovo smolo. Hemoglobin iz liziranih eritrocitov v prisotnosti vodikovega peroksida katalizira oksidacijo gvajakove smole, s katero je premazan filtrirni papir na testu. V reakciji med fenolno skupino α -gvajakove kisline in vodikovim peroksidom nastane visoko konjugirana modro obarvana kinonska spojina. Spremembo barve odčitamo v 30 sekundah po nanosu razvijalne raztopine. Lažno pozitivni rezultati se pojavijo, če preiskovanec jemlje določena zdravila, uživa kuhano rdeče meso, repo ali hren oziroma živila, ki vsebujejo peroksidazo. Lažno negativne rezultate povzročajo tudi veliki odmerki vitamina C.

Omejitev testa z gvajakovo smolo

Test ima nizko specifičnost, ker reagira tudi na prisotnost hema v zaužiti hrani, zato štiri dni pred testiranjem preiskovanec:

- ne sme uživati mesa,
- ne sme uživati redkev, zelja, hrena,
- naj ne uživa vitamina C, preparatov z železom in aspirina,
- naj testiranje odloži, če krvavi iz nosu ali zob.

Imunološki kvalitativni testi

Imunološki kvalitativni testi delujejo po principu protiteles proti molekuli humanega hemoglobina. Hemoglobin v vzorcu blata tvori s protitelesi, ki so adsorbirana na testno površino nosilca, obarvane imunske komplekse, ki jih izvajalec testa zazna kot obarvano črto v testnem polju testne ploščice. Analiza vzorcev blata za ugotovitev prisotnosti krvi z imunološkimi kvalitativnimi testi ima prednosti pred testiranjem z gvajakovo smolo. Za to testiranje dieta pred odvzemom vzorcev blata ni potrebna, test pa je zaradi uporabe protiteles proti humanemu hemoglobinu visoko specifičen. Na tržišču so testi različnih proizvajalcev, ki imajo zaradi uporabe različnih protiteles proti hemoglobinu tudi različno stopnjo občutljivosti.

Omejitve imunoloških testov

Imunološki testi imajo dvojje omejitve:

- mejne vrednosti določi proizvajalec in jih ne moremo spreminjati,
- vizualno odčitavanje rezultatov vključuje individualne razlike med izvajalci testiranja.

Imunološki kvantitativni testi

Za to testiranje dieta pred odvzemom vzorcev blata ni potrebna, zaradi uporabe protiteles proti humanemu hemoglobinu pa je test visoko specifičen. Pri teh testih se za detekcijo humanega hemoglobina uporabljajo monoklonska ali poliklonska protitelesa. Prednost teh testov je v možnosti nastavitve mejne pozitivne koncentracije hemoglobina v blatu, ki ustreza kliničnim značilnostim preiskovanca.

Kvantitativni imunološki test še vedno ostaja presejalni test, zato je priporočljivo, da je visoko občutljiv, s čimer preprečimo možnost lažno negativnih rezultatov.

Druga pomembna prednost teh testov je, da omogočajo izvajanje notranje kontrole kakovosti dela, ki je gvajakov test in večina kvalitativnih testov ne omogoča. Proizvajalci kvantitativnih testov priporočajo, da vsak laboratorij sam določi mejne vrednosti za populacijo preiskovancev, ki jo testira. S kvantitativno metodo lahko določimo že rahlo zvišane koncentracije krvi v blatu, zato ima bolnik možnost za izvedbo diagnostičnih testov in zdravljenja v zgodnejši fazi bolezni.

4. 5. Maščobe v blatu kvantitativno

Uvod in namen določanja

Prebava in absorpcija maščob sta odvisni od delovanja želodca, jeter, pankreasa, črevesne mukoze in črevesne peristaltike.

Pri obstruktivni zlatenici vsebuje blato povečano količino maščobnih kislin, ker se te ne absorbirajo zaradi pomanjkanja žolčnih kislin.

Pri insuficienci pankreasa vsebuje blato več nevtrálnih maščob, ker je zaradi premalo lipaze zmanjšana hidroliza maščob.

Pri steatoreji se z blatom odstranjujejo v maščobah topni vitamini A, D, E in K ter kalcij, fosfor in dušikove spojine.

O povečanem izločanju maščob govorimo takrat, ko bolnik izloči več kot 25 % maščob v suhi snovi blata. Postopki kvantitativnega določanja maščob v blatu so različni in jih izvajajo le redki laboratoriji.

4. 6. Tripsin in kimotripsin v blatu

Uvod in namen določanja

Tripsin in kimotripsin sta proteolitična encima, ki se sintetizirata v pankreasu, od tam pa prehajata v dvanajstnik in tanko črevo. Del pri prebavi neporabljenih encimov se izloča z blatom. Določanje aktivnosti teh encimov v blatu je pomembno za odkrivanje insuficience pankreasa, cistične fibroze in obstrukcije pankreasnih vodov. V blatu pogosteje določamo kimotripsin, ker je stabilnejši encim od tripsina. Izločanje kimotripsina v blatu dobro korelira z njegovim izločanjem v dvanajstnik.

Kimotripsin je na sobni temperaturi stabilen do 10 dni. Pred testiranjem zdravnik izvede stimulacijo pankreasa s sekretinom.

Postopek določanja

Vzorec blata ekstrahiramo z mešanico soli in detergenta, ekstrakt pomešamo s sintetičnim substratom (4-nitroanilin-pentapeptid). Kimotripsin v blatu sproži hidrolizo substrata, ob tem se sprošča 4-nitroanilin, katerega absorbanco merimo pri 405 nm.

Za določanje kimotripsina v blatu uporabljamo komercialno izdelane reagenčne komplete. Pri izvedbi testa se dosledno držimo navodil proizvajalca.

4. 7. Pankreatična elastaza v blatu

Uvod in namen določanja

Pankreatična elastaza, imenovana tudi elastaza-1, je specifična proteaza, ki je prisotna v pankreatičnem soku. Katalizira razgradnjo različnih beljakovin, tudi razgradnjo elastina. Koncentracije elastaze v blatu so pet- do šestkrat večje v primerjavi s tistimi v pankreatičnem soku, zato je določanje pankreatične elastaze v blatu pomembno v diagnostiki eksokrine funkcije pankreasa. Pankreatična elastaza ima tudi visoko občutljivost ter negativno napovedno vrednost za razlikovanje med drisko pankreatičnega izvora in drugih vzrokov zanjo. Podhranjenost, vnetne črevesne bolezni in kronična driska nepankreatičnega izvora lahko povzročijo lažno pozitivne rezultate testa, zato je interpretacija rezultatov tesno povezana s klinično sliko preiskovanca.

Vzorec za analizo

Preiskovanec odda en vzorec blata po spontanem iztrebljanju. Nekaj dni pred odvzemom blata ne sme uživati odvajal ali sredstev proti driski. Vzorec blata odvzame z žličko, ki je pritrjena na pokrov zbiralnika, tako da zajame blato iz globine iztrebka.

Metode določanja

Za določanje elastaze v blatu se uporabljajo encimske imunokemijske metode z dvojnimi monoklonskimi protitelesi proti različnim epitopoma človeške pankreatične elastaze. Pri izvedbi analize dosledno upoštevamo navodila proizvajalca reagenčnega kompleta.

Orientacijske referenčne vrednosti

Rezultate podajamo v μg pankreatične elastaze na g blata. Normalne vrednosti so nad $200 \mu\text{g/g}$ blata. Tudi otroci po enem mesecu starosti imajo normalno več kot $200 \mu\text{g}$ elastaze na 1 g blata. Vrednosti pod $200 \mu\text{g}$ na 1 g blata so indikatorji zmanjšane eksokrine funkcije pankreasa.

4. 8. Kalprotektin v blatu

Uvod in namen določanja

Fekalni kalprotektin je heterodimerna beljakovina, ki veže kalcij. Pri aktivnem vnetju črevesa nastaja v nevtrofilnih granulocitih in v manjši meri tudi v makrofagih. Zaradi aktivnega vnetja nevtrofilci migrirajo v črevesno sluznico, po odmrtnju pa se presnovki njihove razgradnje (tudi kalprotektin) sproščajo v lumen črevesa. Koncentracija kalprotektina v blatu tako neposredno odraža aktivnost vnetja črevesne sluznice.

Kalprotektin je občutljiv biološki označevalec vnetja črevesne sluznice in že uveljavljen kot presejalni test za razlikovanje med organskimi in funkcionalnimi motnjami v črevesni steni, uporaben pa tudi za odkrivanje stopnje vnetja črevesne sluznice in za spremljanje terapije pri kronični vnetni črevesni bolezni (KVČB). Najpogostejša podtipa KVČB sta ulcerozni kolitis in Chronova bolezen. Terapevtski cilj zdravljenja KVČB je zaceljena sluznica, ki jo spremljajo koncentracije kalprotektina, nižje od 50 µg/g blata.

Koncentracija kalprotektina ima boljšo korelacijo s stopnjo aktivnosti vnetja pri ulceroznem kolitisu kot pri Chronovi bolezni. Dokazano je tudi, da so koncentracije kalprotektina pomembno višje pri bolnikih z aktivno Chronovo boleznijo debelega črevesa kot pri bolnikih z izolirano Chronovo boleznijo tankega črevesa.

Vzorec za analizo

Najprimernejši je vzorec prvega jutranjega odvajanja blata. Kalprotektin je odporen proti razgradnji z bakterijami, zato je koncentracija kalprotektina nespremenjena, če vzorec blata hranimo na sobni temperaturi do 3 dni, nato pa začne padati. Priporoča se, da vzorce blata do analize hranimo na 2–8 °C, in to največ 7 dni.

Metode določanja kalprotektina

Uveljavljena metoda za določanje kalprotektina v blatu je encimska imunokemijska metoda z monoklonskimi ali poliklonskimi protitelesi. Postopek izvedbe je zamuden in zahteva laboratorijskega delavca z izkušnjami. Nova generacija testov temelji na imunokromatografskem principu določanja kalprotektina in je uporabnejša. Laboratorijsko osebje mora pri izvajanju določitve kalprotektina v blatu upoštevati navodila proizvajalca reagenčnega kompleta, ki ga uporablja.

Orientacijske referenčne vrednosti

Koncentracije kalprotektina, ki so nižje od 50 µg/g blata, so zanesljiv pokazatelj zaceljene sluznice črevesa. Koncentracija kalprotektina, ki je nižja od 50 µg/g blata, ima visoko negativno napovedno vrednost za izključitev KVČB kot razlog za gastrointestinalne simptome. Za populacijo v starosti od 16 do 50 let se priporoča mejna vrednost 50 µg/g blata.

Otroci:

1 do 6 mesecev	538 µg/g blata
6 mesecev do 3 let	214 µg/g blata
3 do 4 leta	75 µg/g blata
> 4 leta	50 µg/g blata

Omejitve diagnostične uporabnosti kalprotektina

Kalprotektin ni specifičen označevalec vnetja črevesne sluznice. Zvišane koncentracije spremljajo tudi infekcijske in maligne bolezni gastrointestinalnega trakta, jetrno cirozo, portalno hipertenzijo, debelost in sočasno uporabo nesteroidnih antirevmatikov. Kalprotektin je fiziološko zvišan tudi pri majhnih otrocih in starostnikih in je kot diagnostični biološki označevalec uporaben samo pri populaciji, stari od 16 do 50 let. Lažno negativen rezultat lahko dobimo pri zelo tekočem vzorcu blata in pri izolirani Chronovi bolezni tankega črevesa z blago aktivnim vnetjem.

4. 9. Antigen bakterije *helicobacter pylori* v blatu

Uvod in namen določanja

Okužba z bakterijo *Helicobacter pylori* (HP) povzroča različne bolezni želodčne sluznice, kot so kronična vnetja želodca, razjede na dvanajstniku in želodcu, rak na želodcu. HP je 3–5 µm dolga, po Gramu negativna bakterija, ki se naseli pod mukusom v želodčnem in metaplastičnem gastričnem epiteliju dvanajstnika. V želodčni sluznici nekaterih ljudi lahko ostane dolgo, ne da bi povzročala bolezenske težave, pri drugi skupini ljudi pa povzroča kronično vnetje sluznice želodca in/ali dvanajstnika. Vnetje spremljajo lokalna ali sistemska imunska dogajanja in nastanek protiteles tipa IgA in IgG, ki jih lahko dokazujemo v serumu. Ob okužbi se HP izloča tudi z blatom, zato je pri bolnikih, ki imajo težave z želodcem, z imunskimi metodami smiselno določati HP-antigen v blatu, še bolj uporabno pa je določanje HP-antigena za spremljanje učinkovitosti uvedene terapije.

Vzorec za analizo

Preiskovanec odvzame vzorec blata v skladu z navodili laboratorija. Vzorec je treba analizirati takoj ali čim prej po odvzemu. Če analize ni mogoče opraviti takoj, lahko vzorec hranimo 72 ur na 2–8 °C, za daljši čas pa je treba vzorec takoj zamrzniti na –20 °C. Tajanje in ponovno zamrzovanje vzorcev ni dovoljeno. Pred analizo vzorec blata temeljito premešamo. Priporoča se redčenje trdih vzorcev blata, tako da z aplikacijsko ploščico zajamemo vzorec blata in ga prenesemo v epruveto (vialo) z raztopino za redčenje. Z nežnim mešanjem (vrtenjem viala med prsti obeh rok 15 sekund) zagotovimo homogenizacijo vzorca za analizo. Pri tekočih in poltrdih vzorcih pa s pipeto, ki je priložena testnemu kompletu, zajamemo 100 µL vzorca blata in ga prenesemo v vialo z raztopino za redčenje. Z nežnim mešanjem (vrtenjem viala med prsti obeh rok 15 sekund) zagotovimo homogenizacijo vzorca za analizo.

Metode določanja

Uporabljata se dve metodi, encimsko-imunska metoda, ki temelji na merjenju specifične gostote, in imunokromatografska metoda. Obe metodi zagotavljata 100-odstotno specifičnost in občutljivost.

Postopek za kvalitativno določanje HP-antigena v blatu

Pri izvajanju analiznega postopka moramo dosledno upoštevati navodila proizvajalca testnega kompleta.

Postopek za kvantitativno določanje HP-antigena v blatu

Za kvantitativno določanje HP-antigena v človeškem blatu uporabljamo testne komplete različnih proizvajalcev. Pri izvedbi in interpretaciji rezultatov dosledno upoštevamo navodila proizvajalca.

Omejitve diagnostične uporabnosti HP-antigena v blatu

Test je kvalitativen, zato se rezultati uporabljajo izključno v povezavi s klinično sliko bolnika.

Aplikacija antibiotikov, zaviralcev protonske črpalke in bizmutovih pripravkov dva tedna pred izvedbo testa lahko vpliva na rezultate, ki so lažno negativni.

Posledica nezadostne količine vzorca za testiranje je prav tako lažno negativen rezultat. Analiza prevelike količine vzorca lahko zavira pretok tekočin po plasteh testne ploščice in rezultat je neveljaven.

Podaljšana inkubacija lahko daje lažno pozitivne rezultate.

Zaradi inkubacije pri nižjih temperaturah in zaradi skrajšane inkubacije so rezultati lahko lažno negativni.

Vzorčenje v času driske ni priporočeno.

5. PARAZITI V BLATU

Vzorec za analizo

Pri pregledu vzorcev blata za ugotovitev prisotnosti jajčec, ličink, cist, oocist in trofozoitov črevesnih zajedavcev se držimo priporočil, navedenih v nadaljevanju.

Po aplikaciji odvajalnih sredstev, antibiotikov in antimalarikov se spremeni črevesna flora, zato mora preiskovanec vzorce blata za laboratorijske preiskave odvzeti pred aplikacijo naštetih zdravilnih pripravkov ali pa 7 dni pozneje.

Priporoča se odvzem treh vzorcev blata v 10 dneh (odvzem vsak drugi dan). Odvzem dveh ali več vzorcev blata v istem dnevu je neustrezen, prav tako odvzem treh vzorcev v 3 zaporednih dneh. Pregled šestih zaporedno odvzetih vzorcev blata se priporoča pri sumu na amebiazo.

Nekonzervirane tekoče vzorce blata moramo pregledati v 30 minutah po odvzemu, poltrde vzorce v 1 uri, čvrste vzorce blata pa v 1 dnevu po odvzemu. Vzorce, ki jih ne moremo pregledati v priporočenem času, je treba konzervirati. V ta namen se lahko uporabijo različni konzervansi (10-odstotni formalin, mertiolat-jod-formalin (MIF), polivinilni alkohol (PVA) ...).

Na tržišču je na voljo več **komercialno pripravljenih kompletov** (Para-pak, Parasep, Protofix ...), ki so namenjeni zbiranju, fiksiranju in koncentriranju vzorcev blata. V posameznem kompletu sta združena zbiralnik ter sredstvo za fiksacijo in pripravo za filtriranje. Ti kompleti omogočajo občutno skrajšan postopek fiksacije in koncentracije blata. Poleg skrajšanja časa analize je prednost uporabe teh sistemov tudi minimalna izpostavljenost laboratorijskih delavcev možnostim okužbe in nevarnim kemikalijam. Kadar uporabljamo komercialno pripravljene komplete, ki jih zelo priporočamo, **se držimo navodil proizvajalca.**

5. 1. Priprava in pregled nativnega vzorca blata

Pregled nativnega vzorca blata je namenjen dokazovanju različnih razvojnih oblik črevesnih parazitov: **trofozoitov, cist, ličink in jajčec**.

V epruveti (ali na objektnejem stekelcu) suspendiramo manjšo količino blata v fiziološki raztopini. Suspenzijo prenesemo na objektno stekelce in pokrijemo s krovnim stekelcem. Debelina oziroma gostota preparata mora še omogočati branje tiska skozi preparat. Za boljšo vidljivost in razpoznavnost cist, jajčec in ličink lahko dodamo kapljico 2-odstotne Lugolove raztopine. Celoten preparat pregledamo pri 100-kratni povečavi, vse sumljive strukture pa pri 400-kratni povečavi. Pri 400-kratni povečavi je treba pregledati najmanj tretjino preparata. Rezultat podamo kot negativen, če trofozoiti, ciste, jajčeca ali ličinke parazitov niso prisotni, ali kot pozitiven, če odkrijemo trofozoite ali druge razvojne oblike. Pri pozitivnem rezultatu navedemo latinsko ime črevesnega zajedavca in razvojno obliko ali oblike, ki smo jih našli.

5. 2. Priprava in pregled koncentriranega vzorca blata

V primerjavi s postopkom pregleda nativnega vzorca blata omogočajo metode koncentracije najdbo parazitov oziroma njihovih razvojnih oblik, tudi kadar so prisotni v manjšem številu. Uporabimo lahko postopek naplavljanja (flotacije) ali sedimentacije. Princip obeh postopkov je tak, da ciste in oociste protozojev ter jajčeca in ličinke helmintov ločimo od fekalnega debrija s centrifugiranjem in/ali razlikovanjem v specifični gostoti.

5.2.1 Postopek naplavljanja (flotacije)

Pripravimo si nasičeno raztopino natrijevega klorida (350 g NaCl na 1000 mL vode). V epruveto s spatulo vnesemo za grahovo zrno blata in ga zmešamo z 1 mL nasičene raztopine NaCl; to dodajamo do volumna 20 mL in pustimo stati 20 do 40 minut, da jajčeca zajedavcev splavajo na površino. Z žičnato zanko na več mestih na površini tekočine posnamemo zgornje plasti, vsebino nanesemo na objektno stekelce in pazljivo pregledamo celo površino preparata. Če v laboratoriju ni žičnate zanke, nasičeno raztopino NaCl dolijemo do roba epruvete in na epruveto previdno položimo objektno stekelce, počakamo 20 do 40 minut, objektno stekelce dvignemo in pokrijemo s krovnim stekelcem (22 × 22 mm). Postopek pregledovanja preparatov in vrednotenje rezultatov sta enaka kot pri nativnih preparatih. Rezultat označimo kot negativen oziroma – če je pozitiven – z imenom parazita, katerega jajčeca smo odkrili.

Jajčecem zajedavcev so morfološko podobne nekatere rastlinske celice, semena trav, pelodna zrna, eozinofilci ... Ciste črevesnih zajedavcev lahko zamenjamo tudi z zrnci škroba, maščobnimi kapljami, zračnimi mehurčki in semeni trav. Napačni identifikaciji se izognemo tako, da natančno izvajamo postopek koncentracije in da do potankosti poznamo morfološke značilnosti posameznih jajčec in cist.

5.2.2 Postopek sedimentacije

Pripravimo dve raztopini, vodno raztopino mertiolata in raztopino mertiolat-formalina.

Vodna raztopina mertiolata: 1 g mertiolata raztopimo v destilirani vodi in napolnimo do 1000 mL z vodo.

Raztopina mertiolat-formalina: 200 mL vodne raztopine mertiolata dodamo 25 mL konc. Lugolove raztopine.

Tik pred uporabo zmešamo 7 mL raztopine mertiolat-formalina in 0,5 mL Lugolove raztopine (MIF-reagent). Za grahovo zrno blata prenesemo v epruveto z MIF-reagentom, mešamo 5 minut in skozi dvojni sloj gaze prefiltriramo v epruveto za centrifugiranje.

Filtratu dodamo 2 mL etra, zamašimo in stresamo 1 minuto, pustimo stati 4 minute, nato 1 minuto centrifugiramo pri $500 \times G$. Nastanejo štirje sloji: na površini sloj etra, sledijo pa sloj detritusa, sloj MIF-reagenta ter sediment s cistami in jajčeci parazitov.

Čep detritusa odstranimo z vatirano palčko in očistimo stene epruvete, supernatant pa odlijemo. Z dna epruvete odvzamemo vzorec sedimenta, prenesemo ga na objektno stekelce in mikroskopiramo.

Postopek pregledovanja preparatov in vrednotenje rezultatov sta enaka kot pri nativnih preparatih.

5. 3. Pregled perianalnega brisa

Perianalni bris odvzamemo z lepljivim trakom (2 cm) tako, da z njim odtisnemo predel zadnjika in presredka (zjutraj pred iztrebljanjem in umivanjem) ter odvzeti bris brezhibno nalepimo na objektno stekelce. Pri 100-kratni povečavi sistematično pregledamo vso površino brisa. Najdemo lahko jajčeca podančic in goveje trakulje.

Rezultat označimo kot negativen oziroma pozitiven in z imenom parazita, katerega jajčeca smo odkrili.

5. 4. Medicinsko pomembni zajedavci tankega in debelega črevesa

Medicinsko pomembni zajedavci črevesa po taksonomiji spadajo v deblo *Protozoa* (praživali) in deblo *Ameria* (nečlenarji).

Praživali

Okužbe z enoceličarji iz skupine praživali (*Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, *Blastocystis hominis*, *Isospora belli*, *Balantidium coli*) lahko pri človeku povzročijo resnejše bolezni črevesa. Človekovo telo se brani s humoralno in celično imunostjo, vendar je odziv telesa običajno neučinkovit zato, ker imajo praživali zapleten življenjski krog z več stadiji.

Za naštete parazite je značilno, da v ugodnih življenjskih razmerah obstajajo v aktivni obliki, ki se imenuje trofozoit, v neugodnih življenjskih razmerah pa trofozoit pride v mirujočo obliko ali cisto. Prehod iz trofozoitne oblike v cistično imenujemo encistacija, sprostitvev trofozoita iz ciste pa eksistacija. Eksistacija se v črevesu gostitelja pojavi zaradi vlažnega okolja in ugodnih življenjskih razmer. Priporoča se, da za odvzem vzorcev za preiskave blata za ugotovitev prisotnosti aktivnih in mirujočih oblik črevesnih zajedavcev iz taksonomskega debla "praživali" upoštevamo priporočila laboratorija, s katerim sodelujemo.

Nečlenarji

Med nečlenarji so za človeka patogeni črevesni zajedavci iz poddebel *Platyhelminthes* (ploščati črvi) in *Aschelminthes* (valjasti črvi). Ploščati črvi so trakulje in metljaji, valjasti črvi pa gliste. Pri obeh skupinah zajedavcev v blatu iščemo jajčeca, ličinke ali odrasle parazite oziroma dele parazitov (npr. odrivke pri trakuljah).

Priporoča se, da za preiskave blata za ugotovitev prisotnosti jajčec ploščatih in valjastih črvov upoštevamo priporočila laboratorija, s katerim sodelujemo.

6. LITERATURA

1. Straus B. Medicinska biokemija. Jumena, Zagreb, 1988.
2. King Strasinger S. Urinalysis and body fluids. F. A. Davis Company, Philadelphia, 1989.
3. Društvo medicinskih biokemičara Jugoslavije. Izbor postupaka na področju fecesa. Izabrani postopci analiza u kliničko-biokemijskim laboratorijima. Ognjen Prica, Karlovac, 1990.
4. Tietz W B. Textbook of Clinical Chemistry. Saunders company, Philadelphia, 1994.
5. Žirovnik-Pišek A, Malešič I. Vrednotenje postopkov za ugotavljanje okultne krvi v blatu. Diplomsko delo, Ljubljana, 1997.
6. Malešič I. Izbor postopkov za ugotavljanje okultne krvi v blatu. Priporočila RSK za laboratorijsko diagnostiko, 1997.
7. Hundt S, Haug U, Brenner H. Comparative Evaluation of Immunochemical Fecal Occult Blood Tests for Colorectal Adenoma Detection. *Ann Intern Med.* 2009; 150: 162–169.
8. Guittet L, Guillaume E, Levillain R et al. Analytical comparison of three quantitative immunochemical fecal occult blood tests for colorectal cancer screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20: 1492–1501.
9. CLSI. Quality Control of Microbiological Transport Systems, Approved Standard- Second Edition. CLSI document M40-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
10. D’Haens G, Ferrante M, Vermeire S, Baert F, Noman M, Moortgat L et al. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2012; 18: 2218–24.
11. Oord T, Hornung N. Fecal calprotectin in healthy children. *Scand J Clin Lab Invest.* 2014; 74: 254–8.
12. Kurent T, Drobne D. Pomen fekalnega kalprotektina pri kronični vnetni črevesni bolezni. *Gastroenterolog* 2015; 1: 17–24.
13. Lopes A I, Vale F F, Oleastro M. *Helicobacter pylori* infection - recent developments in diagnosis. *World J Gastroenterol* . 2014; 20(28): 9299–9313.
14. Božnar Alič E, Kobe J M. Zajedavci v blatu, seču in krvi. *Zbornik predavanj.* Ljubljana: Slovensko združenje za klinično kemijo, 2008, 1–14.

