

**Univerzita Komenského v Bratislave
Jesseniova Lekárska fakulta v Martine
Ústav mikrobiológie a imunológie**

**Manuál pre odber stolice a perianálneho zlepu na
parazitologické vyšetrenie**

Jana Kompaniková, Elena Nováková

Podporené projektom KEGA 032UK-4/2019

Martin

2019

Manuál pre odber stolice a perianálneho zlepu na parazitologické vyšetrenie

1. Odber, transport a uskladnenie stolice

Vzorky stolice na parazitologické vyšetrenie je vhodné odobrať pred aplikáciou antibiotík, antiparazitík a iných prípravkov. Čerstvú stolicu, najmenej o veľkosti vlašského orecha (3-5 mililitrov), naberieme do vhodnej nádoby s dobre tesniacim uzáverom. Pre parazitologickú diagnostiku stolicu odoberáme 3-krát (každý druhý deň) pre vylúčenie chybných diagnôz vplyvom negatívnej fázy pri cyklickom výskyte parazitov. Nie je vhodné odobrať viac vzoriek stolice od jedného pacienta v priebehu jedného dňa. Vzorky stolice nesmú byť kontaminované vodou ani močom.

Pri podozrení na infekcie vyvolané amébami a dientamébami je potrebné vzorku čerstvej stolice doručiť na mikrobiologické vyšetrenie najneskôr do 30 minút po defekácii. Vzorky stolice na diagnostiku ostatných črevných protozoí je potrebné doručiť do laboratória čo najrýchlejšie, všeobecné odporúčania sú do 1 hodiny po defekácii.

V prípade, že nie je možné rýchle doručenie vzorky do laboratória, je možné túto uskladniť na chladnom mieste (nad bodom mrazu - najmenej 4°C).

Pri negatívnom výsledku vyšetrenia stolice, ale pri pretrvávajúcich príznakoch svedčiacich o črevnej parazitóze, je nutné opakovať odber a vyšetrenie materiálu ešte 2-krát vždy po 4-7 dňoch. Pri suspektnej amebóze a giardióze sa odporúča vyšetrenie stolice opakovať 5-10-krát v dvojdňových intervaloch.

2. Vyšetrenie stolice v laboratóriu

Vzorky stolice vyšetrujeme:

- a) makroskopicky – zistujeme prítomnosť celých červov alebo ich častí, posúdenie konzistencie stolice, prítomnosti hlienu a krvi
- b) natívnym mikroskopickým preparátom – dokazujeme pohyblivé vegetatívne štádiá prvokov (trofozoity),
- c) koncentračnými metódami – používame flotačné a sedimentačné, pri ktorých sa cysty alebo vajíčka vyplávajú zo stolice na hladinu roztokov solí, alebo klesajú ku dnu, nachádzame ich v sedimente
- d) kultivačne – na živnej pôde alebo zvierati, na rozmnoženie niektorých črevných prvokov

- e) farbiacimi metódami – pre diagnostiku prvokov
- f) hrubý náter stolice – na mikroskopický dôkaz vajíčok červov

Koncentračné metódy

Koncentračné metódy používané na dôkaz vajíčok helmintov a cyst protozoí v stolici sú v porovnaní s ostatnými postupmi vhodnejšie pre vyššiu záchytnosť parazitov.

Používajú sa nasledujúce metódy:

- a) flotačná (podľa Fausta)- cysty a vajíčka sa v koncentrovanom roztoku solí vyplavujú na hladinu
- b) sedimentačná (formolová – MIFC) - vajíčka a cysty klesajú ku dnu

Flotácia v sírane zinočnatom (Faust et al. 1939- upravené):

Vzorku natívnej stolice o hmotnosti 1 gramu preniesieme do krvnej skúmavky a pomocou drevenej tyčinky dôkladne rozmiešame vo fyziologickom roztoku alebo v destilovanej vode. Suspenziu centrifugujeme 1 minútu pri 2500 otáčkach/minútu, supernatant opatrne zlejeme a premytý sediment suspendujeme v roztoku síranu zinočnatého o hustote 1,180 (331 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ doplniť destilovanou vodou do objemu 1000 ml). Skúmavku doplníme asi 1 centimeter pod okraj a centrifugujeme 1 minútu pri 2500 otáčkach/minútu. Povrchovú blanku zo skúmavky ihneď preniesieme bakteriologickou kľučkou na podložné sklo a prikryjeme krycím sklíčkom. Povrchovú blanku možno zo skúmavky zobrať priamo na krycie sklíčko tak, že sa skúmavka doplní roztokom až po okraj a krycie sklíčko sa ponechá 20 minút na hladine flotačného roztoku.

Preparát mikroskopujeme - pri použití 100-násobného zväčšenia prezeráme celú plochu krycieho sklíčka a následne pri 400-násobnom zväčšení asi 20 zorných polí.

Sedimentačná (formolová, mertiolát-jód-formaldehydová metóda – MIFCA)

A. Príprava roztokov

1. Roztok merthiolátu:

Merthiolát 1,0 gram

Destilovaná voda 1000,0 mililitrov

2. Zásobný roztok MIF:

destilovaná voda250 mililitrov 1 %

vodný roztok merthiolátu200 mililitrov

36-38% formaldehyd25 mililitrov

glycerín 5 mililitrov

Roztok je potrebné dôkladne rozmiešať a uchovávať v hnedej fľaške so zabrúsenou zátkou.

3. Lugolov roztok

destilovaná voda 100 ml

jodid draselný 10 g

kryštalický jód 5 g

Roztok má byť čerstvý, nie starší ako týždeň. Roztok treba uchovávať v hnedej tmavej fľaši so zabrúsenou zátkou v tme.

B. Popis jednotlivých krokov postupu metódy

1. Pre každú vzorku stolice si pripravíme do stojana 2 skúmavky (Wassermanovu a centrifugačnú).
2. Do centrifugačnej skúmavky dáme lievik so štvorčekom dvojmo skladanej gázy.
3. Do Wassermanovej skúmavky napipetujeme 5 ml zásobného roztoku MIF a 1 ml Lugolovho roztoku.
4. Drevenou tyčinkou pridáme stolicu o veľkosti hrášku a pomocou dvoch paličiek dokonale stolicu homogenizujeme.
5. Suspenziu precedíme cez gázu do centrifugačnej skúmavky a pridáme 7 ml éteru (približne 1 cm pod povrch skúmavky). Skúmavku dôkladne zazátkujeme a silno rukou trepeme 1 - 2 minúty, pokiaľ suspenzia nie je úplne homogénna. Ak nie je suspenzia úplne homogénna (nad vrstvou stolice je éter), pridáme asi 1 ml destilovanej vody, zazátkujeme a znovu pretrepeme.
6. Zátku odstránime, skúmavku postavíme do stojana na 3 minúty, aby sa suspenzia ustálila.
7. Potom centrifugujeme 3 minúty pri 2500 otáčkach/minútu. V skúmavke sú vytvorené po centrifugácii 4 vrstvy: éter, detritus zo stolice, roztok MIF a sediment.
8. Drevenou paličkou oddelíme „zátku“ detritu od steny skúmavky a rýchlym pohybom zlejeme celý supernatant. Vatovým tampónom utrieme vnútornú stenu skúmavky od detritu.
9. Pasteurovou pipetou dôkladne zhomogenizujeme sediment, časť z neho odoberieme, zhotovíme preparát na podložnom sklíčku a prikryjeme krycím sklíčkom.
10. Mikroskopické hodnotenie celého preparátu pri zväčšení 100 až 200x, pri verifikácii

podozrivých útvarov 400 x.

11. Preparát po vyšetrení odložiť do nádoby s dezinfekčným roztokom.

Hodnotenie: Pri náleze vajíčok, cýst a trofozoitov parazita treba určiť jeho rod a druh. V prípade neprítomnosti týchto útvarov je výsledok hodnotený ako negatívny. Táto metóda nie je celkom spoľahlivá na zachytenie oplodnených vajíčok *Ascaris lumbricoides*. V niektorých prípadoch laboratórnej diagnostiky sa mikroskopický dôkaz parazita opiera o morfológické rozlíšenie vnútornej štruktúry bunky. Používa sa preto zafarbený mikroskopický preparát.

Hrubý náter stolice

Vajíčka červov zisťujeme mikroskopicky v tzv. hrubom nátere zo stolice. Na jeho zhotovenie sa najčastejšie používa metóda podľa Heina alebo metóda podľa Katoa. Tieto metódy sú málo zachytne a na dôkaz cýst prvokov sú preto nevhodné.

Náter podľa Heina

Na čisté podložné sklíčko kvapneme destilovanú vodu, v kvapke rozmiešame menšie množstvo stolice v pomere 1 diel vody na 3 diely stolice. Zmes rozotrieme na ploche asi 4 x 2 cm. Náter necháme voľne zaschnúť. Pred vyšetrením preparát prejasníme kvapkou parafrínového oleja a prezeráme pod mikroskopom pri 60 – 100 násobnom zväčšení.

Náter podľa Katoa

Je to koprologická diagnostická metóda, ktorá slúži na záchyt vajíčok parazitov. Jej podstatou je hrubý náter stolice, pri čom sa náter stolice prekrýva celofánovým prúžkom impregnovaným Kato farbiacim roztokom (malachitová zeleň, glycerol, fenol), ktorý slúži na uľahčenie mikroskopického pozorovania vajíčok parazitov.

A. Príprava roztokov

Farbiaci roztok

500 mililitrov 6% fenolu, kryštalický koncentrovaný fenol roztopíme vo vodnom kúpeli

30 mililitrov tekutého fenolu doplníme destilovanou vodou do 500 mililitrov

500 mililitrov glycerínu

6 mililitrov 3% roztoku malachitovej zelene (0,3 gramu malachitovej zelene rozpustiť v 10 mililitroch destilovanej vody).

Nastrihané celofánové prúžky (rozmer 4x2 cm) namáčame minimálne 24 hodín vo farbiacom roztoku. Roztok je stabilný 1 rok.

B. Popis jednotlivých krokov postupu metódy

1. Na podložné sklíčko rovnomerne nanesieme drevenou tyčinkou asi 0,5 gramu vyšetrovanej vzorky stolice
2. Náter stolice prekryjeme prúžkom celofánu namočeným vo farbiacom roztoku
3. Gumenou zátkou rovnomerne roztláčime náter stolice pod celofánom
4. Mikroskopicky hodnotíme celý preparát pri 100 – 200 násobnom zväčšení, podozrivé útvary verifikujeme pri 400- násobnom zväčšení
5. preparát po vyšetrení odložíme do nádoby s dezinfekčným roztokom

Hodnotenie: Podľa charakteristického tvaru, veľkosti a farby možno rozpoznať jednotlivé druhy vajíčok helmintov.

3. Perianálny zleп

Odber materiálu na diagnostiku mrle detskej (*Enterobius vermicularis*) je založený na životnom cykle parazita. Samičky mrle kladú vajíčka na kožné záhyby v okolí análneho otvoru, odkiaľ sa odoberá materiál na mikroskopické vyšetrenie.

Na dôkaz vajíčok *Enterobius vermicularis* sa najlepšie osvedčila metóda podľa Grahama a Brumpta s použitím priehľadnej lepiacej pásky. Odber vykonávame ráno hneď po zobudení (pred rannou toaletou). Perianálnu oblasť neumývame ani predchádzajúci večer, ani pred odberom, niekoľkokrát na ňu pritlačíme pásku (lepiacou stranou na kožu – na perianálne riasy), ktorú potom nalepíme na podložné sklíčko. Vzhľadom k nepravidelnému vylučovaniu vajíčok parazitujúcimi samičkami je na vyšetrenie potrebné odobrať minimálne 3 vzorky s odstupom vždy aspoň 1 deň. Riadne označenú lepiacu pásku prilepenú na podložnom sklíčku odošleme do laboratória.

Ďalšou možnosťou na diagnostiku vajíčok mrle je Schüffnerova metóda, pri ktorej sklenenou tyčinkou vytierame perianálne riasy, materiál z tyčinky spláchneme do kvapky vody na podložnom sklíčku a necháme zaschnúť. Náter sa potom prejasní parafrínovým olejom a prezerá pod mikroskopom.

Stolica nie je vhodnou vzorkou pre dôkaz enterobiózy, nakoľko vajíčka mrlí sa v nej nachádzajú zriedka, bývajú rozptýlené.

ZDROJE:

Nováková E. a kol. Lekárska parazitológia. 1. Vydanie. PRO Banská bystrica. 2006. ISBN 80-89057-13-6. s. 71-94.

Ondriska F. a kol. Klinická parazitológia. 1. vydanie. Univerzita Komenského v Bratislave. Prírodovedecká fakulta. ISBN 978-80-223-4217-9. Bratislava 2016. s. 220 -222. Dostupné: [https://fns.uniba.sk/fileadmin/prif/biol/kek/pareko/Ondriska_a_kol. Klinicka parazitologia.pdf](https://fns.uniba.sk/fileadmin/prif/biol/kek/pareko/Ondriska_a_kol.Klinicka_parazitologia.pdf)

Medirex group. Odber vzoriek. Dostupné na: <https://www.laboratornadiagnostika.sk/pre-lekarov/mikrobiologia/parazitologia/predanalytika/odber-vzoriek>

Gut microbes influence severity of intestinal parasitic infections. Washington University School of Medicine in St. Louis. Dostupné: <https://medicine.wustl.edu/news/gut-microbes-influence-severity-intestinal-parasitic-infections/>