

Analiza stolice u laboratorijskoj medicini

IZV. PROF. DR. SC. NORA NIKOLAC GABAJ

KLINIČKI ZAVOD ZA KEMIJU, KBC SESTRE MILOSRDNICE

Uloga laboratorijskih pretraga stolice



Postavljanje dijagnoze



Praćenje tijeka bolesti



Praćenje uspješnosti liječenja



1. PRETRAGE NA OKULTNO KRVARENJE

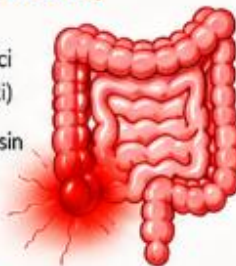


- Gvajak test (okultno krvarenje)
- FIT – fekalni imunokemijski test
- Kvantitativni FIT
- FIT-DNA (DNA test u stolici)



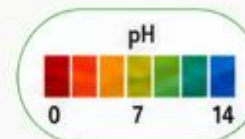
2. UPALNI BILJEZI (INFLAMATORNI MARKERI)

- Fekalni kalprotektin
- Fekalni laktoferin
- Neopterin u stolici
- Mijeloperoksidaza
- S100A12
- CRP u stolici (istraživački)
- α 1-antitripsin (kod upale crijeva)



3. BIOKEMIJSKE PRETRAGE – PROBAVNA FUNKCIJA I MALAPSORPCIJA

- Pankreasa elastaza-1
- Fekalne masti – kvantitativno (Sudan III/72 h)
- pH stolice
- Reducirajuće tvari
- Probavni ostaci hrane
- Amilaza (fekalna)
- Kimitripsin u stolici
- Bikarbonat u stolici
- Bilirubin u stolici
- Test na intoleranciju laktoze (disaharidna malapsorpcija)
- Elektroliti u stolici (Na^+ , K^+ , Cl^-)



4. MIKROBIOLOŠKE PRETRAGE (bakterije, virusi i paraziti)

BAKTERIJE

- Koprokultura (Salmonella, Shigella, Campylobacter, Yersinia, EIEC)
- Toksin Clostridioides difficile (A/B) +/- PCR
- EHEC / STEC
- Vibrio cholerae
- Aeromonas spp.
- Plesiomonas shigelloides
- Antibiotogram



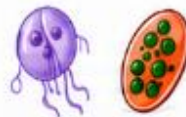
VIRUSI

- Norovirus (antigen/PCR)
- Rotavirus
- Adenovirus
- Astrovirus
- Sapovirus
- Enterovirus
- PCR panel za viruse



PARAZITI

- Jajčeca i paraziti (O&P)
- Giardia lamblia (antigen/PCR)
- Cryptosporidium parvum (antigen/PCR)
- Entamoeba histolytica (antigen/PCR)
- Blastocystis spp.
- Enterobius vermicularis (jajčeca)
- Multiplex PCR panel (bakterije/virusi/paraziti)



5. OSTALI BIOKEMIJSKI MARKERI U STOLICI

- Alfa-1 antitripsin (gubitak proteina)
- Žučne kiseline (7 α -hidroksi-4-kolesten-3-on)
- Bakterijski metaboliti (npr. SCFA)
- Fekalni kreatinin
- Fekalni protein (α 1)
- Imunoglobulin A (IgA) u stolici



6. ANALIZA CRIJEVNOG MIKROBIOMA

- Sekvenciranje 16S rRNA (sastav mikrobiote)
- Metagenomska analiza (funkcionalni potencijal)
- Raznolikost mikrobioma (α -diverzitet, β -diverzitet)
- Metabolomika mikrobioma (SCFA i dr.)
- Indikacije: IBS, IBD (istraživački), prehrana, probiotičke, intervencije



Pretrage na okultno krvarenje

Okultno krvarenje u stolici je prisutnost krvi koje ne uzrokuje makroskopski vidljivu promjenu boje ili izgleda stolice, ali se može dokazati laboratorijskim testovima.

Hematokezija – pojava svježe svijetlocrvene krvi u stolici (najčešće iz rektuma)

Melena – pojava crne, katranaste stolice zbog krvi iz gornjeg probavnog trakta

gFOBT

Kvalitativni
FIT

Kvantitativni
FIT

FIT-DNA

Gvajakov test (gFOBT)

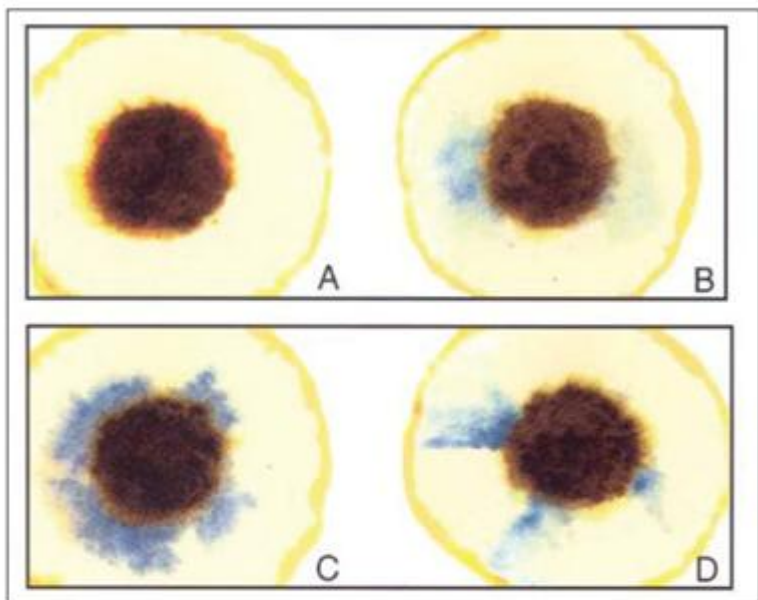


Figure 2. Guaiac test development showing one negative (A) and three positive test results (B,C,D). In the presence of heme and a hydrogen peroxide developer guaiac acid is oxidized producing a blue color. Accurate interpretation of results for GT require training and supervision especially when interpreting borderline results.

Pseudoperoksidazna aktivnost hema katalizira oksidaciju gvajakove smole (uz H_2O_2) → plavo obojenje

Lažno pozitivni rezultati:

- Prehrana (meso, voće i povrće bogato peroksidazama)
- Lijekovi (NSAID)

Potrebna tri uzastopna uzorka!

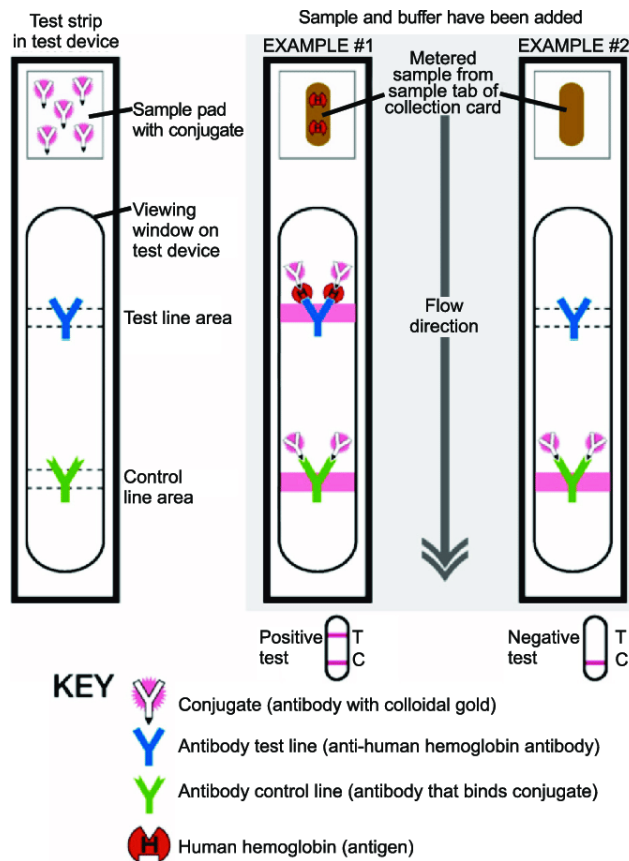
Dijagnostička točnost

Metoda	Ishod	Osjetljivost	Specifičnost	Ref #
Standardni gFOBT	Kolorektalni karcinom	60 % (95 % CI 50–70 %)	91 % (95 % CI 90–93 %)	1
gFOBT – studije bez verifikacijskog biasa	Kolorektalni karcinom	36 % (95 % CI 25–47 %)	96 % (95 % CI 94–97 %)	1
gFOBT – Cochrane	Kolorektalni karcinom	39 % (95 % CI 25–55 %)	94 % (95 % CI 91–96 %)	2
gFOBT – Cochrane	Uznapredovale neoplazije	15 % (95 % CI 12–20 %)	94 % (95 % CI 92–96 %)	2

¹Rosman AS, Korsten MA. J Gen Intern Med. 2010 Nov;25(11):1211-21. doi: 10.1007/s11606-010-1375-0.

²Grobbee EJ, et al. Cochrane Database Syst Rev. 2022 Jun 6;6(6):CD009276. doi: 10.1002/14651858.CD009276.pub2.

Fekalni imunokemijski test - FIT

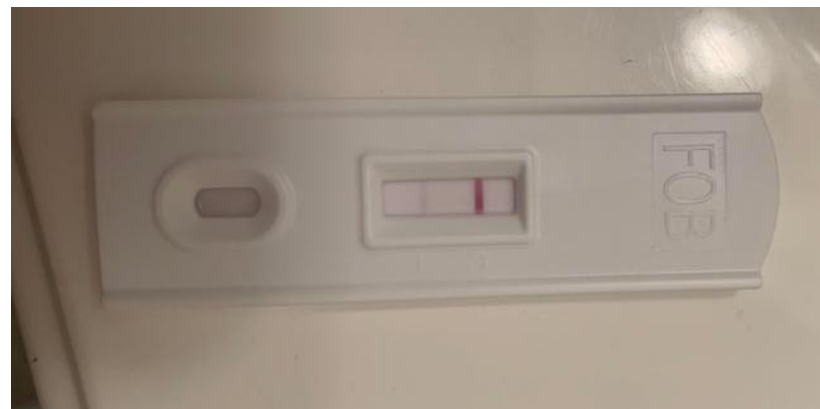


Monoklonska protutijela na humani hemoglobin

LFIA - lateralni protočni imunokromatografski test (engl. *lateral flow immunochromatographic assay*)

Bez pripreme bolesnika

Problem vizualno očitavanje testa



Dijagnostička točnost

Osjetljivost (CRC) > gFOBT

Specifičnost (CRC) $\approx$ gFOBT

Quezada-Diaz FF, et al. Assessing the impact of a single qualitative fecal immunochemical test on colonoscopy prioritization and mortality in risk-stratified patients with suspected colorectal cancer: a retrospective cohort study. *Lancet Reg Health Am.* 2025 Aug 11;50:101201. doi: 10.1016/j.lana.2025.101201. PMID: 40832661; PMCID: PMC12359272.

	Patients referred to FIT n = 808
Colorectal cancer n	25
True positive	24
False negative	1
False positive	259
True negative	524
Sensitivity % (95% CI)	96.0 (76.6–99.9)
Specificity % (95% CI)	66.9 (63.5–70.2)
PPV % (95% CI)	8.5 (5.5–12.3)
NPV % (95% CI)	99.8 (98.9–100)
LR+	2.90
LR–	0.06

FIT: Fecal immunochemical test; CI: confidence interval. 95% confidence intervals (CI) calculated using Clopper-Pearson exact method for proportions.

Table 3: Diagnostic accuracy of fecal immunochemical test (FIT) for colorectal cancer detection.

Kvantitativni FIT



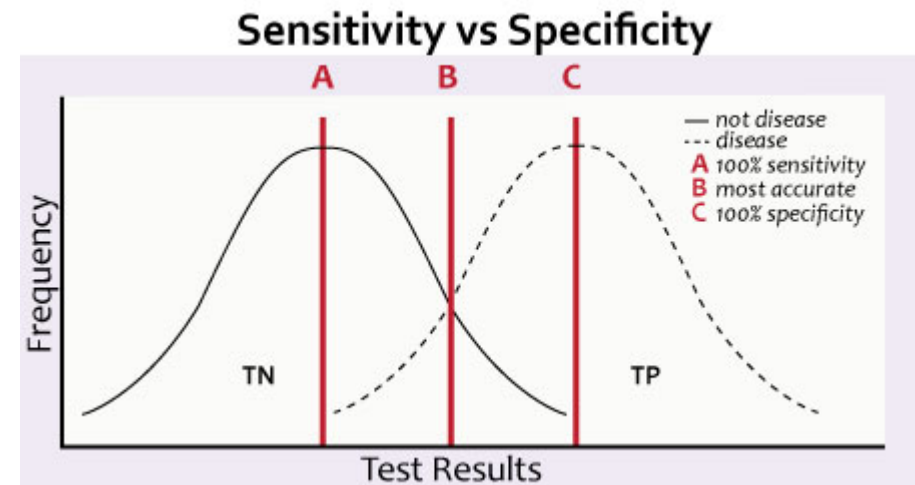
Kvantitativni FIT



Imunoturbidimetrija

$\mu\text{g Hb/g stolice}$

Prilagodba granične vrijednosti (osjetljivost, specifičnost)



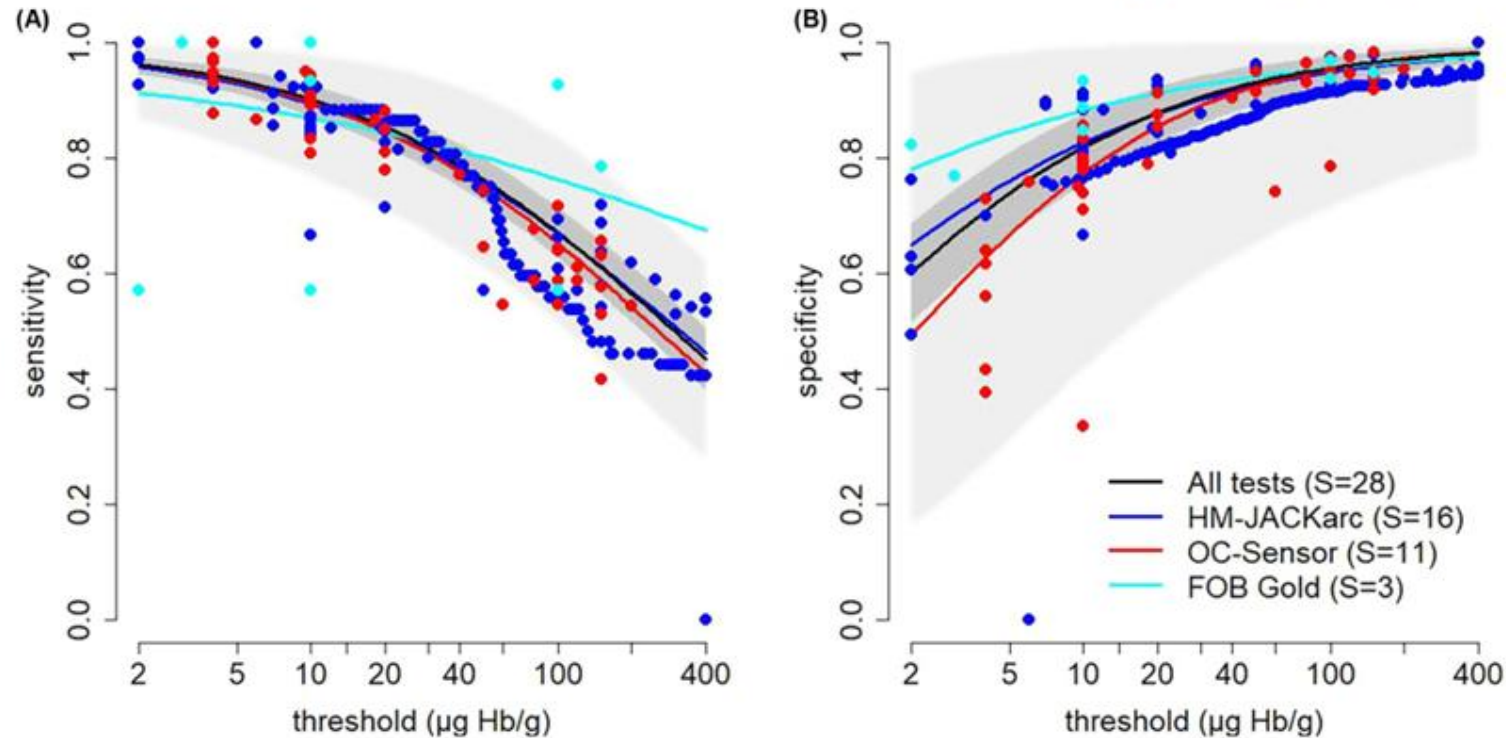


FIGURE 2 Sensitivity and specificity for all tests. The 95% credible intervals and predictive intervals for summary sensitivity and specificity of analysis including all tests are shown by the dark and light grey regions. Individual points are study specific data. Note that the number of studies in the 'all tests' category does not equal the sum of all the studies since some studies were excluded to avoid double counting patients and some studies reported data for more than one test.

Prilagodbom granične vrijednosti postiže se znatno veća specifičnost, uz zadovoljavajuću osjetljivost!

Višeciljni DNA test

Višeciljni DNA test (engl. *multitarget stool DNA test*, mt-sDNA ili FIT-DNA test)

- FIT
- analiza molekularnih biljega iz tumorskih stanica koje se ljušte u lumen debelog crijeva (mutacije *KRAS*, metilacije *BMP3* i *NDRG4*)

Table 1. Sensitivity and Specificity of the Next-Generation Multitarget Stool DNA Test and the Commercial FIT.*					
Variable	Colonoscopy (N = 20,176)	Next-Generation Multitarget Stool DNA Test (N = 20,176)		FIT (N = 20,176)	
	No. of Participants	No. of Results	Assessment (95% CI)	No. of Results	Assessment (95% CI)
			%		%
Sensitivity					
Colorectal cancer					
Any	98	92	93.9 (87.1–97.7)†	66	67.3 (57.1–76.5)
Stage I, II, or III‡	82	76	92.7 (84.8–97.3)	53	64.6 (53.3–74.9)
Advanced precancerous lesions	2,144	931	43.4 (41.3–45.6)†	500	23.3 (21.5–25.2)
High-grade dysplasia	114	85	74.6 (65.6–82.3)	54	47.4 (37.9–56.9)
Specificity					
Advanced neoplasia§	17,934	16,245	90.6 (90.1–91.0)	16,997	94.8 (94.4–95.1)¶
Nonneoplastic findings or negative colonoscopy	10,961	10,156	92.7 (92.2–93.1)	10,492	95.7 (95.3–96.1)
Negative colonoscopy**	7,510	7,012	93.4 (92.8–93.9)	7,207	96.0 (95.5–96.4)

Značajka	gFOBT	Kvalitativni FIT	Kvantitativni FIT	FIT-DNA (mt-sDNA)
Princip	Pseudoperoksidazna reakcija hema	Imunokromatografsko dokazivanje humanog hemoglobina	Automatizirano imunokemijsko određivanje humanog hemoglobina	FIT + analiza tumorske DNA
Analit	Hem	Humani hemoglobin	Humani hemoglobin	Humani hemoglobin + mutacije KRAS + metilacija BMP3 i NDRG4
Specifičnost za humani hemoglobin	Ne	Da	Da	Da
Predanalitička priprema bolesnika	Da	Ne	Ne	Ne
Broj uzoraka	3	1	1	1
Način očitanja	Vizualno	Vizualno	Automatizirano	Automatizirano
Rezultat	Pozitivan/negativan	Pozitivan/negativan	Kvantitativan (µg Hb/g stolice)	Pozitivan/negativan
Mogućnost prilagodbe granične vrijednosti	Ne	Ne	Da	Ne
Osjetljivost za CRC	35–40%	66–92%	79%	93,9%
Specifičnost za CRC	95–96%	62–96%	94%	92,7%
Glavne prednosti	Jednostavan i jeftin	Brz, jednostavan, bez predanalitičke pripreme bolesnika	Automatiziran, objektivan, mogućnost prilagodbe granične vrijednosti, standard probira	Najveća osjetljivost za CRC i uznapredovale prekancerozne lezije
Glavna ograničenja	Mala osjetljivost, prehrambene interferencije	Vizualno očitavanje i međulaboratorijska varijabilnost	Analitički sustavi nisu potpuno međusobno usporedivi	Visoka cijena, složena molekularna analiza i ograničena dostupnost



Program probira raka debelog crijeva

Hrvatski zavod za javno zdravstvo / Služba za epidemiologiju i prevenciju kroničnih nezaraznih bolesti / Program probira raka debelog crijeva

🕒 Zadnja izmjena:
10. svibnja 2021.
15:05

🖨 Ispiši stranicu



Preventivni
program
Za zdravlje. Danas.

Nacionalni program
ranog otkrivanja
raka debelog crijeva



Od 2008. godine

Test: gFOBT

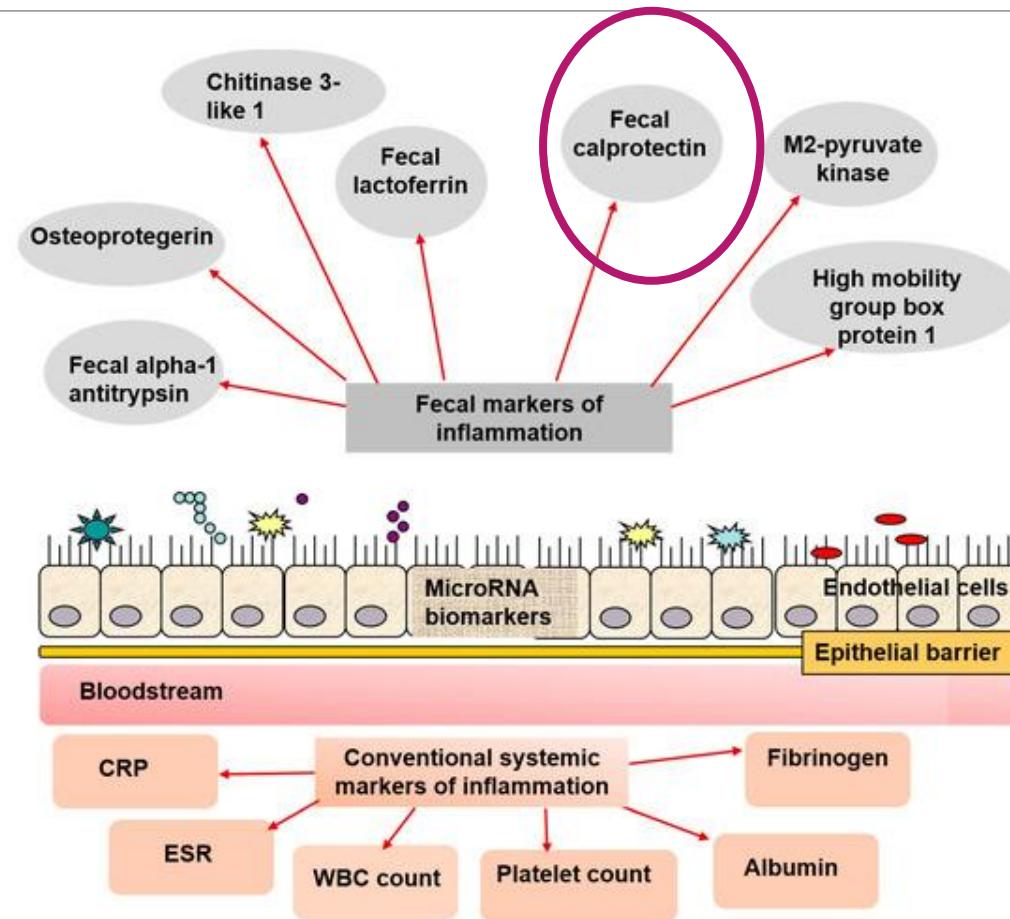
Žene i muškarci, 50-78 godina

Svake dvije godine

Odaziv (zadnji ciklus) 36%

2025. reorganizacija i uvođenje FIT

Upalni biljezi u stolici



Kalprotektin

Heterodimerni protein veličine 24 kDa iz obitelji S100 kalcij-vezujućih proteina

Dvije podjedinice: S100A8 i S100A9

Kelira ione Zn, Mn, Fe

Najveći dio u neutrofilnim granulocitima (60% proteina citoplazme)

Manje u monocitima, makrofagima, aktiviranim epitelnim stanicama

Upala → migracija i aktivacija neutrofila u crijevnoj sluznici
→ otpuštanje u lumen crijeva → izravan pokazatelj
intenziteta neutrofilne upale



Određivanje fekalnog kalprotektina

Razlikovanje upalne bolesti crijeva (IBD) od sindroma iritabilnog crijeva (IBS)

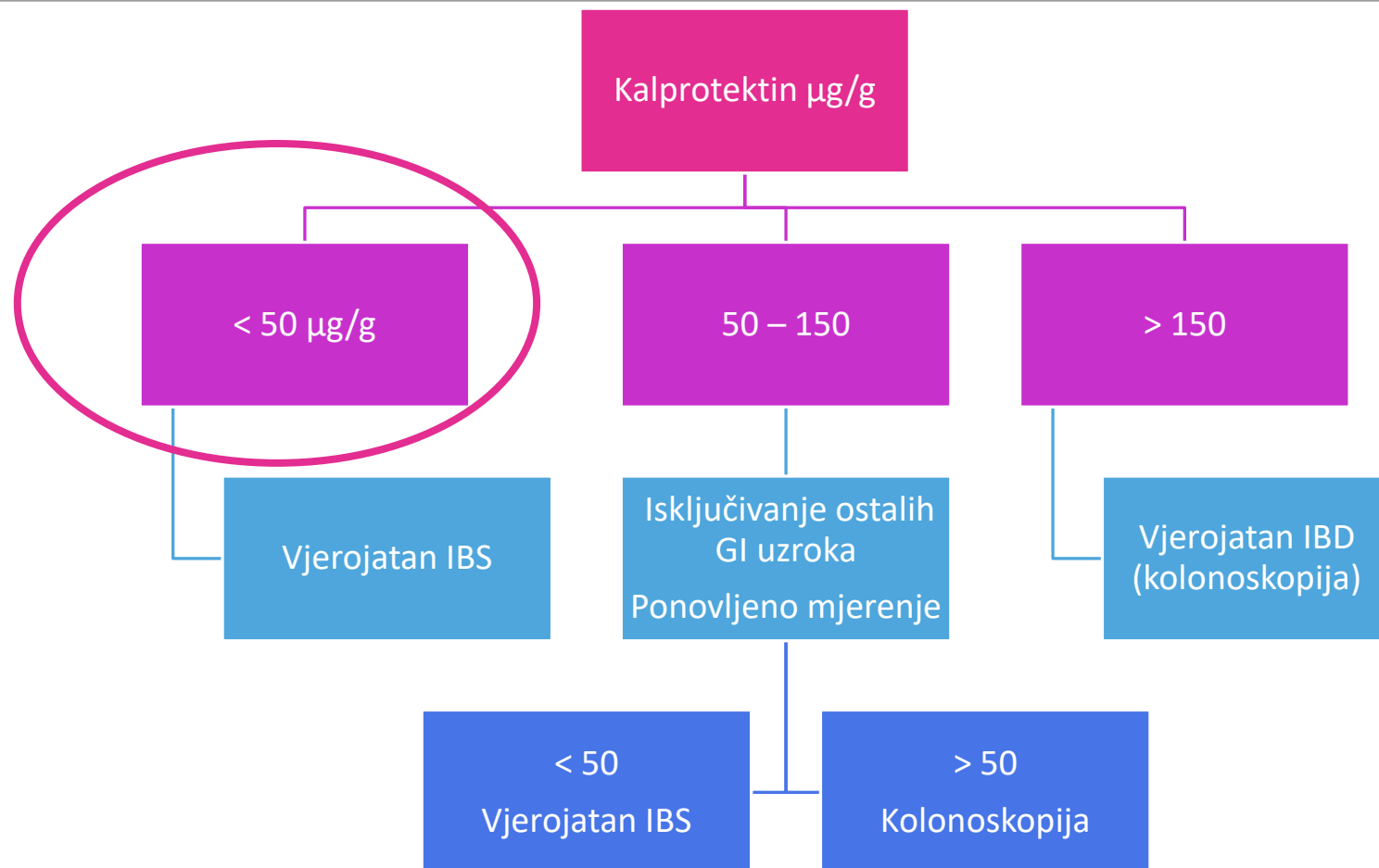
Procjena aktivnosti bolesti

Procjena endoskopskog i histološkog cijeljenja sluznice

Praćenje odgovora na liječenje

Rano otkrivanje relapsa i postoperativnog recidiva Crohnove bolesti

Dijagnostički algoritam IBD vs. IBS



Postavljanje dijagnoze (IBD vs. IBS)

Cut-off	Osjetljivost	Specifičnost
50 µg/g	92 % (90–94 %)	60 % (52–67 %)
100 µg/g	84 % (80–88 %)	66 % (59–73 %)
250 µg/g	80 % (76–84 %)	82 % (77–86 %)

Lin JF, Chen JM, Zuo JH, Yu A, Xiao ZJ, Deng FH, Nie B, Jiang B. Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity. *Inflamm Bowel Dis*. 2014 Aug;20(8):1407-15. doi: 10.1097/MIB.0000000000000057. PMID: 24983982.

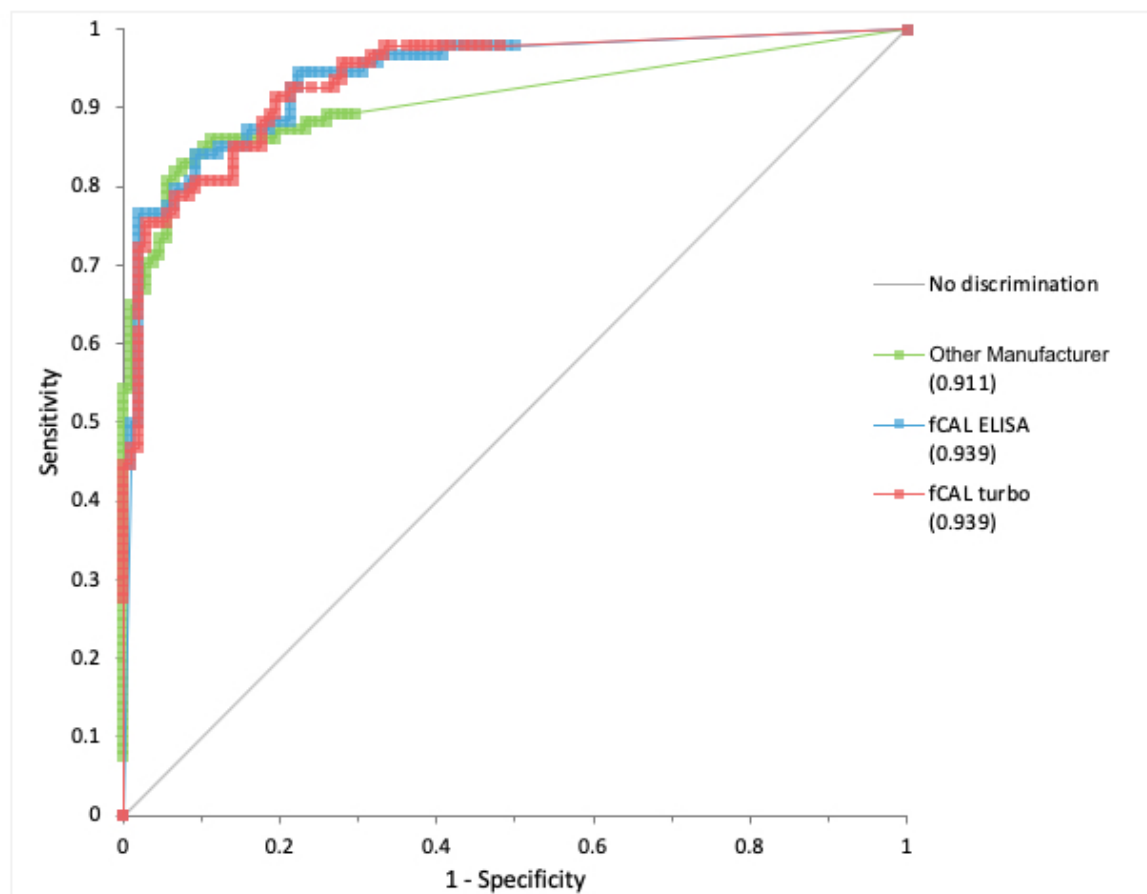
Pooled Cut-off (Meta-analiza)	Osjetljivost	Specifičnost
50 µg/g	85,8% (78,3–91,0%)	91,7% (84,5–95,7%)

Lin JF, Chen JM, Zuo JH, Yu A, Xiao ZJ, Deng FH, Nie B, Jiang B. Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity. *Inflamm Bowel Dis*. 2014 Aug;20(8):1407-15. doi: 10.1097/MIB.0000000000000057. PMID: 24983982.

The BÜHLMANN fCAL® turbo sets a new standard in the industry:

A clinical study with a total of 248 adult and pediatric patients was performed to assess the ability of the BÜHLMANN fCAL® turbo to discriminate between patients with IBD and other non-inflammatory GI disorders, including IBS. A subset of this population (94 IBD vs 108 IBS) that included only samples that were run with another manufacturer's assay were used to create the ROC curve below to provide a competitive comparison.

- High diagnostic **accuracy** (AUC 0.939)
- Excellent **sensitivity** at cut-off of 80 ug/g of 91.1%: avoid false negatives in IBD/IBS screening!
- Clinically proven, stable and consistent **standardization** (same as BÜHLMANN fCAL® ELISA) established in 2006
- Outstanding **method comparison** to the BÜHLMANN fCAL® ELISA
- Narrow **clinical grey zone** between 80 ug/g and 160 ug/g
- More than **100 clinical**, **peer-reviewed publications**
- The BÜHLMANN fCAL® turbo and BÜHLMANN fCAL® ELISA are the **only global assays** with IVD registrations in the US (FDA), Canada (HC), Europe (CE-IVD), Japan (PMDA), China (SFDA), Australia (TGA), Brazil (ANVISA) etc.



ROC curve comparison, 94 IBD vs. 108 IBS subjects:

- **Red curve** = BÜHLMANN fCAL® turbo; AUC = 0.939
- **Blue curve** = BÜHLMANN fCAL® ELISA; AUC = 0.939
- **Green curve** = Other Manufacturer; AUC = 0.911

Granične vrijednosti ovisne o metodi!

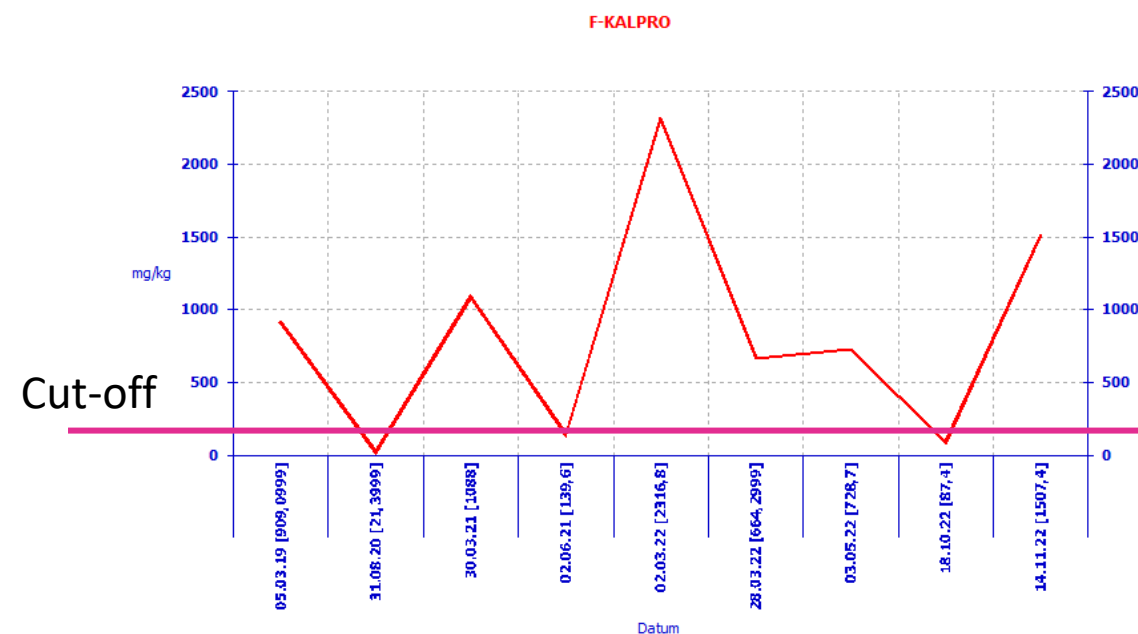
Uloga u praćenju bolesti

Bolji pokazatelj aktivnosti IBD-a od serumskih biljega

Trajno povišene vrijednosti ($>250 \mu\text{g/g}$) povezane su s većim rizikom relapsa

Ulcerozni kolitis: vrijednosti $<250 \mu\text{g/g}$ povezane s odsutnošću teških endoskopskih lezija, a $<150 \mu\text{g/g}$ upućuju na endoskopsku i histološku remisiju

Crohnova bolest: serijska određivanja kalprotektina mogu pomoći u ranom otkrivanju postoperativnog recidiva i smanjiti potrebu za učestalim endoskopskim kontrolama.



Fekalna elastaza

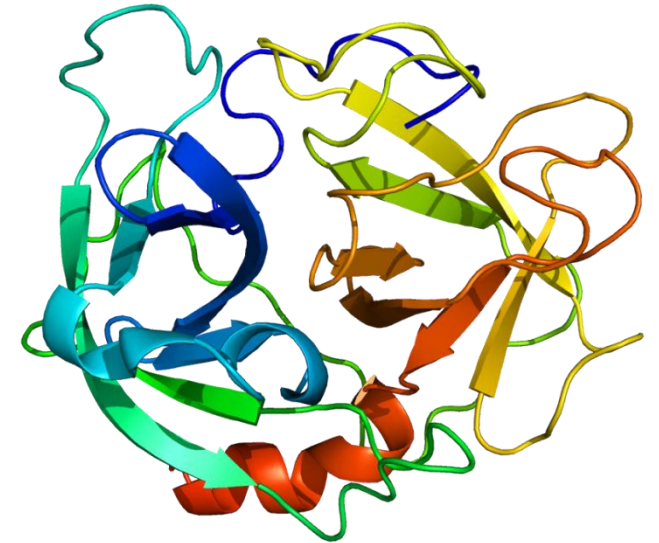
Elastaza-1 je proteolitički enzim koji sintetiziraju acinusne stanice gušterače i izlučuje se u duodenum zajedno s ostalim probavnim enzimima

Nema proteolitičke razgradnje u crijevima

U stolici 5x viša konc. nego u pankreasom soku

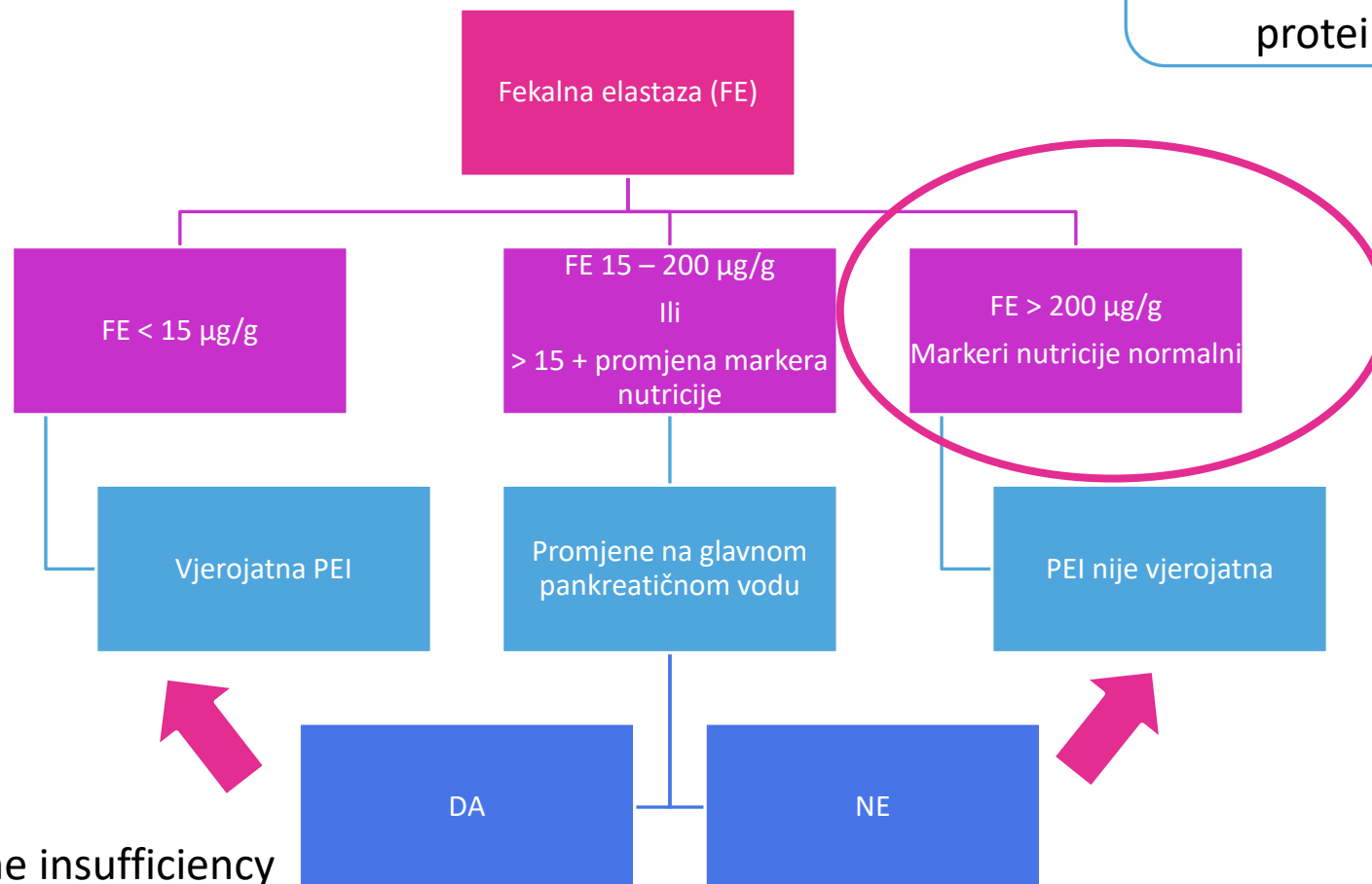
Dobro odražava egzokrinu sekreciju gušterače

Određivanje: imunokemijske metode s monoklonskim protutijelima specifičnim za humane pankreasne izoforme elastaze (CELA2 i CELA3)

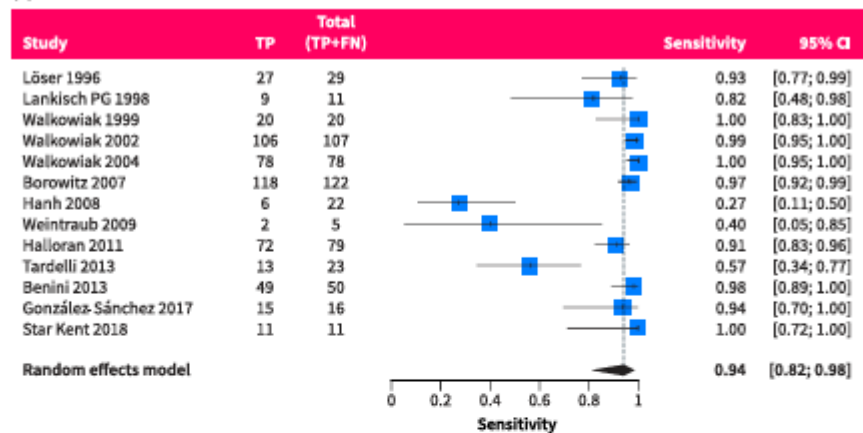
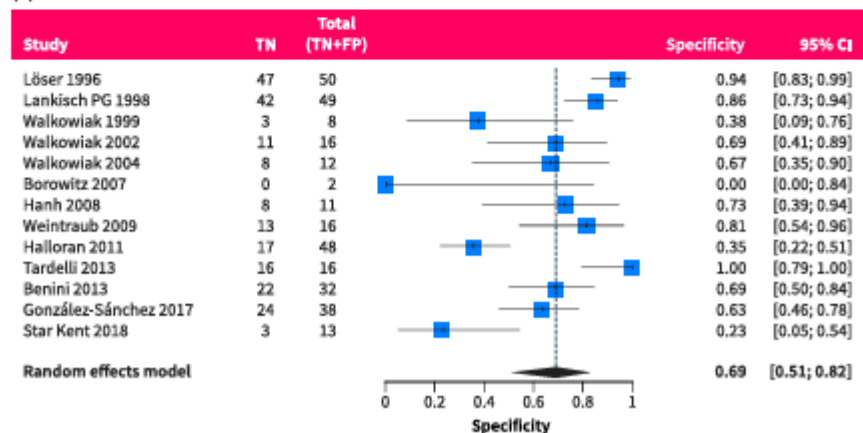
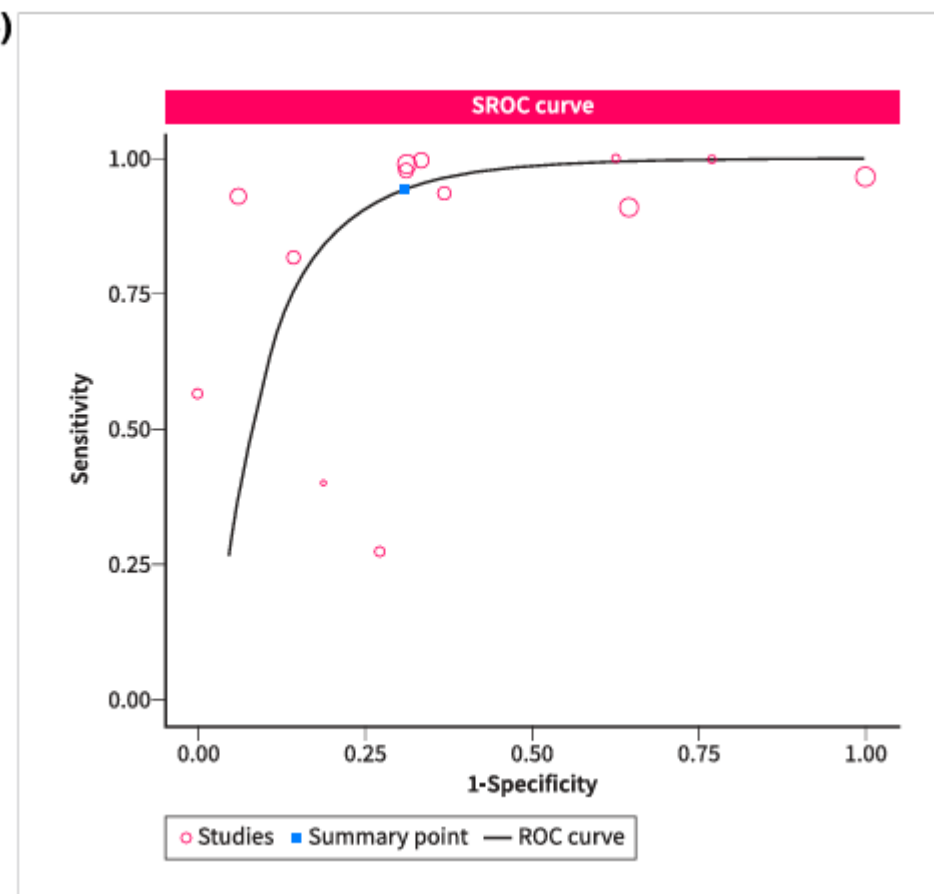


Dijagnostički algoritam

Markeri nutritivne: Proteini, hemoglobin, albumin, prealbumin, retinol-vezujući protein, HbA1c, Ca, Mg



PEI – pancreatic exocrine insufficiency

(A)**(a)****(b)****(B)**

Meta-analiza, 13 istraživanja, 888 bolesnika

Dijagnoza egzokrine disfunkcije gušterače:

cut-off 200 $\mu\text{g/g}$: Os = 94%, Sp = 69%

cut-off 100 $\mu\text{g/g}$: Os = 88%, Sp = 82%

FIT je metoda izbora za dokazivanje okultnog krvarenja i probir CRC-a

Fekalni kalprotektin ključan je neinvazivni biljeg crijevne upale i praćenja IBD-a

Fekalna elastaza-1 metoda je izbora za procjenu egzokrine funkcije gušterače

Kvantitativni testovi omogućuju prilagodbu graničnih vrijednosti ovisno o potrebama za osjetljivošću i specifičnošću

Kod interpretacije uzeti u obzir analitička i predanalitička ograničenja

