

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SANJA KOPER

DIPLOMSKA NALOGA

Visokošolski strokovni program
laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SANJA KOPER

**PRIMERJAVA ŠTIRIH METOD ZA DOLOČANJE
KRVI V BLATU**

**COMPARISON OF FOUR METHODS FOR
DETERMINING BLOOD IN STOOL**

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem opravljala v centralnem laboratoriju Univerzitetnega kliničnega centra Maribor.

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Milanu Skitku in somentorju mag. Maksimiljanu Gorenjaku za pomoč pri nastajanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi Petri Romih in Mateju Gošnjaku za njuno pomoč pri eksperimentalnem delu.

Najlepše se zahvaljujem tudi moji družini, ki mi je v času študija vedno stala ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Milana Skitka, mag. farm., spec. med. biok., in somentorja mag. Maksimiljana Gorenjaka, mag. farm., spec. med. biok.

Ljubljana, september 2009

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Jana Lukač Bajalo

Član diplomske komisije: doc. dr. Mitja Kos

VSEBINA

1	UVOD.....	1
1.1	SPLOŠNE ZNAČILNOSTI KRVI.....	1
1.1.1	<i>Krvne celice.....</i>	2
1.2	HB.....	4
1.2.1	<i>Protein globin.....</i>	6
1.2.2	<i>Prostetična skupina hem.....</i>	6
1.3	PREBAVA.....	7
1.3.1	<i>Blato.....</i>	9
1.4	POMEN DOLOČANJA KRVI V BLATU.....	9
1.4.1	<i>Metode določanja FOB.....</i>	10
2	NAMEN DELA.....	13
3	MATERIALI IN METODE.....	14
3.1	IZBIRA VZORCEV.....	14
3.2	OPIS TESTOV.....	14
3.2.1	<i>Hemoccult® test.....</i>	14
3.2.2	<i>H&R FOB – Transferrin.....</i>	16
3.2.3	<i>ImmoCARE – C.....</i>	18
3.2.4	<i>FOB Gold Sentinel.....</i>	20
3.3	STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV.....	22
4	REZULTATI.....	23
5	RAZPRAVA.....	30
6	SKLEPI.....	34
7	LITERATURA.....	35

POVZETEK

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti primerljivost in zanesljivost različnih testov za določanje okultne krvi v blatu. V ta namen smo testirali 80 vzorcev blata s štirimi različnimi testi za dokaz okultne krvi v blatu. Testi, ki smo jih uporabili, se razlikujejo tudi po metodi dokazovanja prisotnosti hemoglobina v blatu. Prvi test, ki smo ga uporabili, je gvajak test Hemoccult[®], nato smo vzorce testirali z dvema kvalitativnima imunokemijskima testoma H&R FOB – Transferrin in ImmoCARE – C ter na koncu z novejšim kvantitativnim imunokemijskim testom FOB Gold Sentinel. Za statistično obdelavo dobljenih rezultatov smo uporabili Kappa analizo na programu Analyse - it[®].

Gvajak test Hemoccult[®] se v laboratoriju uporablja v vsakdanji praksi, zato smo na podlagi rezultatov, dobljenih s tem testom, zbrali 20 negativnih, 40 slabo pozitivnih in 20 pozitivnih vzorcev. Le-te smo nato testirali še s preostalimi tremi testi. Dobljene rezultate smo nato statistično obdelali in tako ugotovili, kakšno je ujemanje teh različnih testov. Ugotovili smo, da se najslabše ujema gvajak test Hemoccult[®]. Vzrok je najverjetneje v slabi specifičnosti testa Hemoccult[®] in v potrebni dieti, katere se veliko pacientov ne drži. Dobro ujemanje imunoloških testov je najverjetneje zaradi njihove specifičnosti na humani hemoglobin in podobnega principa dokazovanja humanega hemoglobina. Razlike med rezultati imunoloških testov so najverjetneje nastale zaradi različnih mejnih vrednosti oziroma različnih analitičnih občutljivosti testov. Prednost kvantitativnega imunološkega testa FOB Gold Sentinel je tudi v možnosti, da si lahko sami določimo mejno vrednost v skladu z analitično in klinično validacijo testa.

Rezultati kažejo, da dajejo imunokemijski testi zanesljivejše rezultate kot gvajak test, vendar ne moremo reči, kateri izmed njih daje najzanesljivejše. Za to bi potrebovali klinično validacijo na večjem vzorcu preiskovancev. Imunološki testi so zagotovo testi prihodnosti.

ABSTRACT

The purpose of the diploma thesis is to establish the comparability and reliability of different tests for determining fecal occult blood. For this purpose we have tested 80 stool samples with four different tests for determining fecal occult blood. The tests that were used differ also in terms of the method for determining presence of hemoglobin in stool. The first test used was the Guaiac test Hemoccult[®], then the samples were tested with two qualitative immunochemical tests H&R FOB – Transferrin and ImmoCARE – C and, finally with the newer quantitative immunochemical test FOB Gold Sentinel. For statistical processing of the obtained data, Kappa analysis was used on the Analyse - it[®] program.

The Guaiac test Hemoccult[®] is being used in the lab on a daily basis, therefore we have collected 20 negative, 40 slightly positive and 20 positive samples based on the results achieved with this test. These tests were then tested using the remaining three tests. The results obtained were then statistically processed, and thus the closeness of agreement between the different tests was established. We have established that the closeness of agreement is the poorest in the Guaiac test Hemoccult[®]. The reason is probably poor specificity of the Hemoccult[®] test and the required diet, which many patients do not observe. The good closeness of agreement of immunological tests is probably due to their specificity to the human hemoglobin and the similar principle of proving human hemoglobin. The differences between the results of immunological tests are most probably a consequence of different threshold values and different analytical sensitivity of tests, respectively. The advantage of the quantitative immunological test FOB Gold Sentinel is also in the possibility for us to determine the threshold value in line with the analytical and clinical test validation.

The results show that immunological tests provide more reliable data than the Guaiac test, however, it is impossible to say which one provides the most reliable data. For this we would require a clinical validation on a large sample of persons. Immunological tests are certainly tests of the future.

SEZNAM OKRAJŠAV

Hb – hemoglobin

hHb – humani hemoglobin

Pt – protitelo

Ag – antigen

O₂ – kisik

CO₂ – ogljikov dioksid

CO – ogljikov monoksid

Fe – železo

Fe² – dvovalentno železo

Fe³⁺ – trivalentno železo

P – fosfor

S – žveplo

Ca – kalcij

H₂O₂ – vodikov peroksid

k – kappa koeficient

FOB – fecal occult blood (okultna kri v blatu)

IZ – interval zaupanja

1 UVOD

1.1 Splošne značilnosti krvi

Kri je tekoče tkivo in se nahaja v vseh organih.[9] Reakcija krvi je slabo alkalna, pH je 7,2 do 7,3.[1] Organi iz krvi dobijo vse snovi, ki jih potrebujejo za opravljanje svojih nalog in v kri vračajo razne prebavne produkte ter tudi hormone. Kri je v stalnem kontaktu z organi in nam zato da pomembne informacije o njihovem stanju. Sestavljena je iz krvne plazme in krvnih celic.

Krvna plazma je sestavljena iz:[9]

- vode (~92 %);
- beljakovin (albumin, fibrinogen, protitelesa, faktorji strjevanja krvi...) (6–8 %);
- soli (0,8 %);
- lipidov (0,6 %);
- ogljikovih hidratov (natančneje glukoza; 0,1 %);
- hormonov;
- mineralov;
- vitaminov.

Krvne celice so:

- rdeče krvničke ali eritrociti;
- bele krvničke ali levkociti;
- krvne ploščice ali trombociti.

Ker je kri v stalnem kontaktu z organi, nam lahko da pomembne informacije o njihovem stanju.[3] Ena od nalog krvi je tudi regulacija. Kri je zelo pomembna pri vzdrževanju homeostaze, prav tako voda v krvi pomaga pri regulaciji telesne temperature, za vzdrževanje

pH krvi pa je pomemben krvni puferski sistem. Ena najpomembnejših nalog je transport, saj kri prenaša številne snovi med organi. Te snovi so:[9]

- topni produkti prebave (glukoza, aminokisline, vitamini, minerali), ki jih kri prenaša od črevesja v jetra in nato po celem telesu;
- odpadne snovi iz presnove (sečnina, kreatinin), ki jih kri prenaša v jetra in ledvice da se odstranijo;
- hormoni, ki jih kri prenaša od žleznih celic (kjer nastajajo), do tarčnih celic (kjer delujejo);
- dihalna plina kisik (O_2) in ogljikov dioksid (CO_2);
- plazemske beljakovine;
- soli in protitelesa (Pt).

Prav tako ima kri tudi obrambno vlogo, saj varuje telo pred virusi, bakterijami in drugimi patološko spremenjenimi telesnimi celicami. Za to so odgovorne bele krvne celice, ki tujke spoznajo in uničijo s tvorbo Pt ali s fagocitozo.[9]

1.1.1 Krvne celice

Krvničke delimo v tri skupine, ki se razlikujejo po izvoru, zgradbi in funkciji. Eritrociti in trombociti so le v žilnem sistemu, levkociti pa lahko aktivno prehajajo v tkiva skozi kapilarne stene, kjer opravljajo nekatere funkcije, zlasti obrambne.[2]

Krvne celice nastajajo v hemopoetskem tkivu, ki se pri odraslem nahaja v rdečem kostnem mozgu. V tem hemopoetskem tkivu se nahajajo matične celice, iz katerih se razvijejo vse vrste krvnih celic. Matične celice imajo dve pomembni lastnosti, ki se ne pojavita pri ostalih telesnih celicah. Le-ti sta: pluripotentnost (pomeni, da se lahko razvijejo v različne oblike oz. vrste krvnih celic) in samoobnavljanje (pomeni, da lahko tvorijo identične kopije samih sebe).[3]

Rdeče krvne celice ali eritrociti

So bikonkavne ploščice s premerom približno 7 mikronov in debelino 2 mikrona. Njihovo barvo jim daje pigment hemoglobin (Hb).[1] Eritrociti nimajo jedra, zato jim manjkajo genetske informacije. Svojo zgradbo in dejavnosti lahko ohranjajo največ 4 mesece. 70 % njihove mase zavzema Hb. Njihova oblika omogoča učinkovito izmenjavo snovi s plazmo, s čimer je pospešena tudi difuzija med plazmo in eritrociti. Elastičen citoskelet jim omogoča, da spremenijo svojo obliko, tako da lahko prehajajo tudi skozi ozke kapilare. Zaradi nekaterih encimov in Hb lahko eritrociti po organizmu prenašajo O_2 ter CO_2 . Prav tako vsebujejo encim karboanhidrazo, ki pospešuje vezavo CO_2 z vodo, pri čemer nastane hidrogenkarbonatni ion (HCO_3^-).[2] Odmrle eritrocite iz vranice kri nato odplavlja v jetra. Vranica in jetra predelajo Hb v žolčna barvila in pripravijo za izločanje druge izrabljene sestavine eritrocitov. Odmirajoče eritrocite v krvi sproti nadomeščajo drugi eritrociti.[1]

Bele krvne celice ali levkociti

Levkociti so skupina treh vrst obrambnih celic. Njihova življenjska doba je dva do tri tedne. So okrogle celice z jedrom in so po večini večje od eritrocitov. Vrste levkocitov se med seboj razlikujejo po velikosti, obliki jedra in po tem, s katerimi celičnimi barvili se obarvajo. Glede na te lastnosti delimo levkocite na:

- granulocite – mikroskopsko jih prepoznamo po zrnih v citoplazmi. Nepretrgoma nastajajo v kostnem mozgu. Granulocite še naprej delimo glede na to, s katerim barvilom se obarva. Delimo jih na:
 - a) eozinofilni granulociti (zrnca v citoplazmi se obarvajo rdeče);
 - b) bazofilni granulociti (značilna so groba in modro obarvana zrnca);
 - c) nevtrofilni granulociti (značilna zelo številna in drobna vijolično obarvana zrnca);
- agranulocite – so brez zrn v citoplazmi. Sem spadajo:
 - a) limfociti – po velikosti ne presegajo eritrocitov. Jedro je razmeroma veliko in okroglo. V primerjavi z jedrom imajo zelo malo citoplazme;
 - b) monociti – imajo mnogo citoplazme. Jedro je veliko in fižolaste oblike. So dva- do petkrat večji kot eritrociti.

Levkociti so pomembni telesni zaščitniki, ki varujejo telo pred škodljivimi mikrobi in tujki. Premikajo se tako, da iztezajo svoje citoplazemske podaljške. Tako se lahko celo zrinejo skozi kapilarno steno krvi v druga tkiva. Levkociti se masovno zbirajo okoli delcev, ki jih je treba odpraviti iz telesa. Te delce levkociti fagocitirajo. Nekateri levkociti, kot so limfociti, varujejo telo tudi z izločanjem gama globulinov, torej protiteles.[1]

Krvne ploščice ali trombociti

So bikonveksne ploščice brez jedra in vsebujejo nekatere sestavne dele citoplazme. V primerjavi z eritrociti so tri- do šestkrat manjši.[1] Trombociti ščitijo organizem pred izgubo krvi ob poškodbah žilnih sten. Aktivno sodelujejo pri strjevanju krvi.[2]

1.2 Hb

Hb je hemoprotein, čigar primarna funkcija je transport O_2 od pljuč do ostalih tkiv. Prvič so ga izolirali leta 1849. Je prvi oligomerni protein, ki je bil okarakteriziran z ultracentrifugo, in prvi, ki mu je bila določena točna molekulska masa in opisana njegova fiziološka funkcija.[4] Poleg primarne funkcije pa Hb na direkten ali indirekten način prenaša tudi CO_2 po telesu.

Hb je globularni protein z dimerjem 6,4 nm in molekulsko maso približno 64,500 Da. Sestavljen je iz štirih podenot globina, ki so urejene tako, da na sredini tvorijo majhno votlino. Vsaka globinska veriga tvori zanko in tako naredi žepek, v katerem se nahaja skupina hem. Skupina hem ima nalogo vezave O_2 . [4] Skupina hem je sestavljena iz štirih pirolnih obročev, urejenih v porfirin. Z vezavo dvovalentnega železa (Fe^{2+}) na oba dušika nastane hem. Zraven se veže še globin, kar omogoči lažjo vezavo O_2 , kadar parcialni tlak O_2 zunaj naraste in ga lahko hitro odda, kadar parcialni tlak O_2 zunaj pade. Hb, na katerega je vezan O_2 , imenujemo oksihemoglobin.[5]

V odraslem človeku predstavlja HbA najmanj 96 % totalnega Hb v krvi. HbA je sestavljen iz dveh normalnih α in dveh normalnih β – polipeptidnih verig, kar simbolično predstavimo kot $\alpha_2\beta_2$. HbA₂ predstavlja približno 2,5 do 3,0 % totalnega Hb v krvi. Sestavljen je iz dveh α in

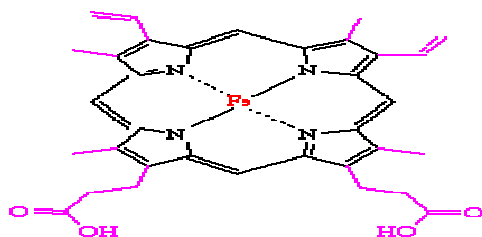
dveh δ – polipeptidnih verig in ga simbolično predstavimo kot $\alpha_2\delta_2$. Prav tako prisoten pri odraslem je tudi fetalni hemoglobin (HbF), vendar v manj kot 1 % totalnega Hb. HbF dominira v času fetusa in se nato močno zmanjša v prvem letu starosti. HbF se od HbA razlikuje po drugačni zgradbi globina, glede na vsebnost in vrstni red aminokislin. HbF ima tako zraven dveh normalnih α – polipeptidnih verig še dve γ – polipeptidni verigi in ga simbolično predstavimo kot $\alpha_2\gamma_2$. [4] Zraven normalno prisotnih Hb v krvi, ki smo jih ravno kar našeli, lahko v krvi najdemo tudi modificirane Hb, ki normalno niso prisotni. Le-ti so lahko: karboksihemoglobin, methemoglobin in sulfhemoglobin. Vsak od teh treh modificiranih Hb ima svoje karakteristike, glede na katere jih ločujemo med seboj. [4]

Karboksihemoglobin se formira z vezavo CO preko O_2 na Hb. Koncentracija karboksihemoglobina lahko doseže 20 % v posameznikih, ki so izpostavljeni CO. Najpogosteje so izpostavljeni na delovnih mestih. Opravljanje fizičnega dela ali nalog je oteženo že pri koncentraciji karboksihemoglobina v krvi do 10 %. Pri koncentracijah od 15 do 20 % pa se pojavijo omotičnost, glavobol in bruhanje. Če koncentracija karboksihemoglobina preseže 50 % totalnega Hb v krvi, lahko nastopi tudi smrt. [4]⁴

Methemoglobin nastane v primeru, če Fe^{2+} oksidira v trivalentno železo (Fe^{3+}) in se hem tako spremeni. Železo (Fe) iz hema je normalno v reducirani obliki Fe^{2+} . V alkalnih pogojih je Fe oksidirano v obliki Fe^{3+} . Ta oksidacija spremeni hem v hemin in Hb v hemoglobin oz. methemoglobin. Ta Hb je nesposoben za transport O_2 , zato so posamezniki, pri katerih je methemoglobin prisoten, cianotični. [4]

Sulfhemoglobin nastane pri reakciji hema s snovmi, ki vsebujejo žveplo (S). Pride do ireverzibilne kemične reakcije, pri kateri se S veže na porfirinski obroč. Najpogostejši vzrok za nastanek sulfhemoglobina je izpostavljenost drogam. Sulfhemoglobin prav tako kot methemoglobin ni zmožen transportirati O_2 in tudi tukaj je posledica cianotičnost. [4]

V starosti se pogosto spremeni globin v Hb, kar povzroči slabšo vezavo O_2 . Posledica tega je, da starejši več niso sposobni hoditi v hribe, saj se mnogo hitreje pojavi pomanjkanje O_2 kot pri mlajših ljudeh. [5]



Slika 1: Zgradba hema.

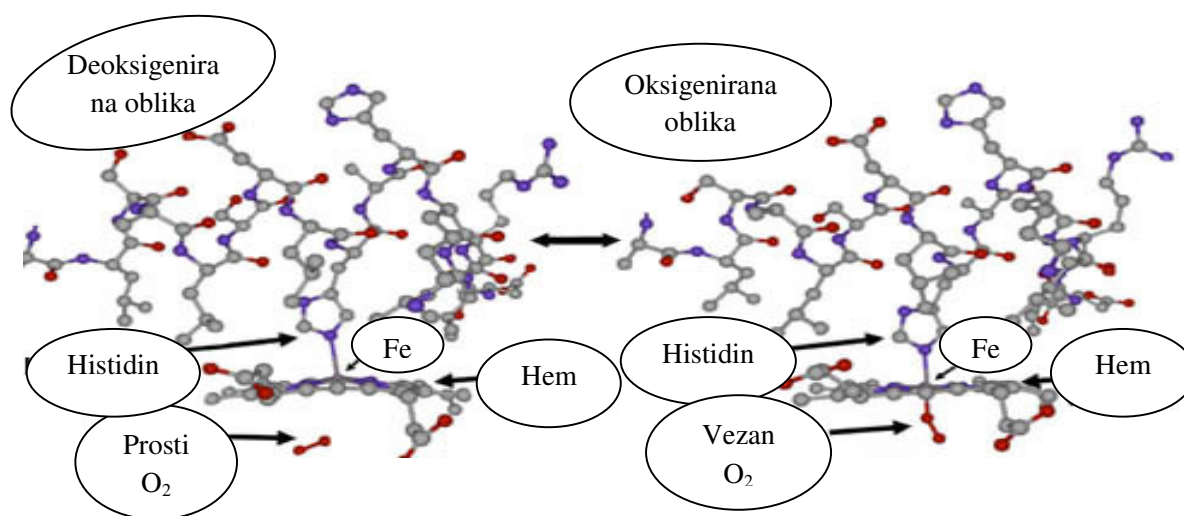
1.2.1 Protein globin

Geni, ki kontrolirajo α verige, se nahajajo na kromosomu 16. α veriga je dolga več kot 28 kb in se bere s 5' konca proti 3' koncu. β , γ in δ – globinski deli se nahajajo blizu skupaj na 11 kromosomu. Zaporedje se bere s 5' konca. Sekvenca gena je en ϵ – gen, ki mu sledita dva γ – gena, psevdo $\psi\beta$ – gen, δ – gen in še en gen, ki določa δ – verigo. Tako kot vsi geni je globin sestavljen iz eksonov in intronov, s kodoni (zaporedje treh nukleotidov), ki kodirajo specifične aminokisline. Globin ima tri eksone in dva introna s promotersko regijo na 5' koncu vsakega gena. Transkripcija in translacija sta pri globinu enaki kot pri ostalih aminokislinah.[4]

1.2.2 Prostetična skupina hem

Hem, železov protoporfirin IX, je sestavljen iz štirih pirolnih obročev, ki obdajajo Fe atom. Ta železov atom se s štirimi od šestih elektronskih parov veže na dušikove atome, z enim od ostalih elektronskih parov se poveže s histidinskim ostankom iz globinske verige, z drugim prostim elektronskim parom pa lahko veže in transportira molekule O₂. [4] Skupina hem je v neplanarnem stanju kadar je deoksigenirana, kar pomeni, da nima vezane molekule O₂. Fe atom je v takšnem stanju pomaknjen iz ravnine porfirina proti histidinskemu ostanku, na katerega je pripet. Kadar skupina hem veže O₂ atom, je oksigenirana in takrat je v planarnem stanju. Takrat Fe atom leži v ravnini porfirinskega obroča. Planarno in neplanarno stanje pa je

pomembno za ostale proteine Hb. Kadar se atom Fe v oksigeniranem stanju pomakne v ravnino porfirina, se tudi histidinski ostanek premakne bližje hem skupini. Ta premik histidinskega ostanka premakne pozicije ostalih aminokislin, ki so mu blizu. Kadar se pri oksigeniranem stanju premaknejo aminokisline v proteinu ene hem skupine, se spremeni celotna zgradba proteina. Nova oblika omogoča lažjo vezavo molekul O_2 na ostale tri hem skupine Hb. Tako vezava ene molekule O_2 na Hb poveča zmožnost Hb, da veže še več molekul O_2 . [10]



Slika 2: Slika prikazuje Hb v deoksigenirani in oksigenirani obliki.

1.3 Prebava

Med prebavnimi procesi se kompleksne in telesu tuje molekule pretvarjajo v manjše ter enostavnejše, ki jih organizem vsrka. Selektivnost prebavnih in presnovnih procesov je majhna: prebavni sistem ne uravnava vnašanja snovi v organizem in tvorbe rezervnih snovi ter porabe snovi glede na potrebe organizma. Njegova vloga je le oskrbovanje notranjega okolja s snovmi iz zunanjega. Organizem je sposoben sprejemati mnogo večje količine hranil kot znašajo njegove potrebe, zato imajo lahko nekatere zaužite snovi za organizem neugodne ali nevarne posledice. [2] Organi, ki prebavljajo, se imenujejo prebavila. K prebavilom sodijo

prebavna cev in prebavne žleze. Prebavno cev sestavljajo: ustna votlina, golt, žrelo, požiralnik, tanko in debelo črevo ter danka z zadnjikom. Prebava se tako deli na mehansko in kemično.[1]

Mehanska prebava: začetni del mehanskega prebavljanja imenujemo žvečenje. Hrana se mehansko prebavlja še na vsej poti skozi prebavila, kajti prebavni organi ob stiskanju mešajo in gnetejo hranilno vsebino. Mehansko prebavljanje hrane omogoča in pospeši kemično prebavo.[1]

Kemična prebava: zaužito hrano kemično prebavljajo prebavni sokovi.[1] Med kemičnim pretvarjanjem hrane v prebavni cevi nastajajo iz makromolekul, ki so glavna sestavina hrane, majhne molekule, ki jih celice lahko uporabijo.[2] Telo zmore zadržati in izkoristiti samo tiste snovi v zaužiti hrani, ki se topijo v vodi ali v maščobah. Netopljive snovi se morajo zato najprej kemično razgraditi v enostavnejše topeljive sestavine. V nasprotnem primeru jih bo telo neuporabljene iztrebilo z blatom.[1]

Nekoliko zgoščeni iztrebki se najprej nabirajo v danki. Izpraznjevanje debelega črevesa nadzira živčni mehanizem, ki se vzdraži ob raztezanju danke, ko se le-ta do neke mere napolni. Pobude iz vznurjenega centra nam sporočajo, da je treba blato iztrebiti, prav tako gredo pobude istočasno tudi v notranji sfinkter, ki samodejno popusti že ob prvih pobudah. Zunanji sfinkter pa uravnavamo sami, tako da pri zdravem odraslem človeku popusti šele na zavestna povelja. Obenem se energično skrči tudi danka, ki ob sodelovanju trebušnih mišic vsebino iztisne na prosto. Zdrav človek deficira enkrat do dvakrat dnevno ali pa samo enkrat na dva dni. Redno iztrebljanje je pomembno, da se ne bi strupi iz debelega črevesa v preveliki količini vsrkali v kri. Pri dolgotrajnem zaprtju jetra ne morejo sproti razstrupljati vseh strupov iz debelega črevesa, kar lahko postane nevarno zaradi postopnega samozastrupljanja. Tudi driska je škodljiva, še posebej, če traja dalj časa, saj telo tako izgublja preveč vode in soli.[1]

1.3.1 Blato

Pri zdravem odraslem človeku, ki se urejeno hrani, je blato praviloma mehka oblikovana svetlo do temnorjava masa. Obarvajo ga barvila, ki nastanejo v črevesu iz žolčnih barvil in iz holesterola. Blato je sestavljeno v večini iz vode (60–80 %), preostali del je suha snov (20–40 %). Z vodo defeciramo neprebavljene ostanke hrane, kot mišična in vezivna vlakna, celulozo, škrobna zrnca, maščobe. Prav tako z blatom izločimo tudi strupe, soli, žolčne kisline, holesterol, organska barvila, sluz, anorganske snovi (P, Fe, Ca), odlučene in bolj ali manj razkrojene epitelijske celice ter maso živih in odmrlih črevesnih mikrobov. Normalen vzorec blata tako vsebuje: vodo, elektrolite, bakterije, celulozo in neprebavljene delce hrane, produkte črevesnega izločanja, žolčne pigmente (urobilinogen, sterkobilinogen in njihove oksidacijske produkte), proste maščobne kisline, lipide in dušikove spojine. Dnevna količina iztrebkov se ravna po količini in kakovosti hrane ter se giblje od 100 do 200 g na dan.[1]

1.4 Pomen določanja krvi v blatu

Ugotavljanje okultne krvi v blatu (FOB) je danes najpogosteje uporabljena metoda za odkrivanje bolezni prebavil. Uporaba ustreznih testov je zelo pomembna, ker se tako lahko odkrijejo rakasta obolenja črevesa v zgodnji fazi razvoja.[6] Obstajajo številni dokazi, da uporaba FOB testov v asimptomatski populaciji, kot presejalni test za raka na črevesju zmanjšajo umrljivost za rakom.[13] Študije so dokazale, da uporaba FOB testov zmanjša umrljivost za kolorektalnim karcinomom, če se pacienti s pozitivnim rezultatom podvržejo kolonoskopiji.[18] Kljub temu, da je kolonoskopija najbolj natančna metoda za odkrivanje kolorektalnega karcinoma, so se zaradi slabe dostopnosti, velikih stroškov in možnih posledic v številnih državah uveljavili FOB testi, ki ugotavljajo prisotnost krvi v blatu.[17] Skoraj vse vrste kolorektalnega karcinoma in tudi mnoge druge bolezni, iz katerih se rak lahko razvije, povzročajo krvavitve. Te krvavitve so lahko akutne ali kronične, močne ali rahle, vidne ali prikrita.[8] Vsaka izguba krvi z blatom, večja kot 2,42 mg Hb/g blata, je posledica patoloških

sprememb na črevesju, vendar ni nujno, da so količine Hb pri bolnikih z rakom vedno nad to vrednostjo.[6]

Za določanje okultne krvi v blatu se priporoča izbira testa z ustrezno občutljivostjo. Kriterij za občutljivost je fiziološka izguba krvi. Prav tako pomembno je testiranje treh različnih vzorcev blata. Zavedati se moramo, da negativen rezultat še ne izključi obolenja z rakom. Kadar je test pozitiven, je potrebno točno določiti vzrok in mesto krvavitve.[6]

Testi FOB so neinvazivni. Pozitiven rezultat pomeni opozorilo zdravniku za obstoj gastrointestinalne bolezni. Uporaba testov za vse ljudi nad 45. letom starosti je smiselna, saj bi le tako odkrili kolorektalne karcinome v zgodnjem stadiju bolezni, ko je še veliko možnosti za ozdravitev.[8]

1.4.1 Metode določanja FOB

Pri postopkih za ugotavljanje FOB gre za dokaz Hb kot sestavnega dela krvi.[8] Možen parameter za dokaz FOB je tudi albumin, kot sestavni del krvi.[7] Dokaz prisotnosti FOB predstavlja le pomoč za pravilno postavitve diagnoze in za uvedbo ustreznega zdravljenja. Metode za določanje FOB so:[8]

- semikvantitativne (temeljijo na barvni reakciji);
- fizikalno-kemične metode (fluorimetrična metoda);
- imunološke metode.

Zavedati se moramo, da je zelo pomembna izbira metode za FOB. Zato pri strokovni odločitvi upoštevamo:[8]

- možen vpliv Fe na rezultate kemičnih testov;
- vpliv rastlinskih peroksidaz;
- dieto;

- občutljivost metod;
- specifičnost metod.

Nespecifični testi za ugotavljanje FOB temeljijo na peroksidazni lastnosti Hb. Na rezultate vplivajo številni dejavniki in tem se poskušamo izogniti:[6]

- zdravnik mora bolnika opozoriti na to, da mora imeti dieto (štiri dni pred in tri dni med testiranjem) ne sme uživati mesa, nekatere zelenjave (redkev, zelje) in sadja;
- med testiranjem naj bolnik ne uživa vitamina C, preparatov z Fe, aspirina in drugih nesteroidnih antiinflatornih zdravil;
- testiranje se mora odložiti, če bolnik krvavi iz nosu, zob, med menstruacijo, če ima hemoroide ali pa diarejo;
- delno se lažno pozitivnim rezultatom izognemo s prekuhavanjem blata;
- analiziramo samo sveže vzorce blata;
- vzorec blata mora biti odvzet iz različnih delov fekalne mase;
- testiramo najmanj tri zaporedne vzorce blata od različnega iztrebljanja.

Dokaz z gvajak smolo

Najpogosteje uporabljena metoda za dokaz FOB je z gvajak smolo. Uporabljajo se samo testi z ustrežno občutljivostjo. Uporabljajo se testni lističi in razvijalni reagent. Vse dobimo od proizvajalca.[6] Ti testi niso analitično specifični za humani hemoglobin (hHb). Potrebna je dieta pred in med testiranjem, vendar so nekatere raziskave pokazale, da dieta ni potrebna. Potencialnim interferencam zaradi rastlinskih peroksidaz se lahko izognemo tako, da pustimo blato na testnem lističu sušiti 48 ur preden ga analiziramo. Analize so tudi pokazale, da nizke doze aspirina ne povzročajo krvavitev.[13] Pri testih, ki temeljijo na psevdoperoksidazni aktivnosti, je prav tako pomemben zamudni efekt, saj Hb ni stabilen v blatu. Ta peroksidazna aktivnost temelji na prisotnosti Fe v porfirinskem obroču. Črevesne bakterije lahko odstranijo Fe atom dokler je blato v črevesju. Raziskave pa so pokazale, da se Fe atom lahko odstrani

tudi zunaj črevesja. Zato proizvajalci gvajak testov priporočajo, da se blato analizira takoj. Raziskave so pokazale, da se občutljivost zmanjša, če se zakasni testiranje.[15] Če pustimo blato v posodicah za odvzem, se v vlažnem okolju lahko začne bakterijska degradacija hema.[13]

Dokaz z aminopirinom

FOB lahko določimo tudi z aminopirinom. Tukaj postopek ni tako enostaven. Količini 0,5 mg blata dodamo 6 mL vode, 2–3 kapljice koncentrirane očetne kisline, to prekuhavamo 13 minut, ohladimo, filtriramo. Vzorcju dodamo enak volumen etanolne raztopine aminopirina (60 g aminopirina raztopimo v 1 L koncentriranega etanola). S kapalko dodamo 5–6 kapljic 3-odstotne raztopine vodikovega peroksida (H_2O_2) (1 mL 30-odstotne raztopine H_2O_2 razredčimo z vodo do 10 mL). Po treh do štirih minutah opazujemo spremembo barve na mejnem sloju. Če se le-ta ne spremeni v vijoličasto ali modro, je rezultat negativen.[6]

Imunološko določanje

Zadnje čase se vedno več uporabljajo imunološke metode za dokazovanje FOB. T.i. imunološki testi imajo številne prednosti, kot so: večja občutljivost, lažje zbiranje (samo eden ali dva vzorca), ni potrebna dieta, bolj specifični za krvavitve iz spodnjega dela gastrointestinalnega trakta, lahka izvedba.[13] Zadnje študije so dokazale tudi druge prednosti imunokemijskih testov pred gvajak testi. Te prednosti so naslednje:[19]

- nekateri imunokemijski testi so lahko opravljeni z avtomatiziranim kemijskim analizatorjem, kar pripomore k večjemu številu opravljenih testov;
- lahko so kvantitativni, kar pomeni, da dobimo točen rezultat;
- nekateri instrumenti lahko berejo kode na testih, kar omogoči direkten vnos pacientov in rezultatov v računalnik.

Imunokemijski testi temeljijo na uporabi monoklonalnih ali poliklonalnih Pt proti hHb.[13] Tvorbo kompleksov antigen (Ag) – Pt, ki nastanejo, lahko nato določimo z imunodifuzijo, imunofluorescenco in encimskimi tehnikami.[6]

2 NAMEN DELA

Test na prisotnost FOB je pomemben v diagnostiki za zgodnje odkrivanje raka in drugih bolezenskih stanj na črevesju, predvsem pri preiskovancih brez simptomov.

Za analizo bomo izbrali 80 vzorcev blata. Vzorce bomo analizirali s štirimi različnimi testi za ugotavljanje prisotnosti okultne krvi v blatu. Testi, ki jih bomo uporabili, so:

- Hemoccult[®] – gvajak test, ki temelji na peroksidazni lastnosti Hb;
- H&R FOB - Transferrin – kvalitativni imunokemijski test, ki temelji na specifičnih Pt proti hHb in specifičnih Pt proti transferinu;
- ImmoCARE - C – kvalitativni imunokemijski test, ki temelji na specifičnih Pt proti hHb;
- FOB Gold Sentinel – kvantitativni imunokemijski test, ki temelji na specifičnih Pt proti hHb.

Vse vzorce, ki bodo oddani v laboratorij, bomo testirali. Vzorci bodo od naključnih pacientov. Testirali bomo vse vzorce blata, ki jih bo oddal posamezni pacient. Vse vzorce bomo najprej testirali s testom Hemoccult[®]. Na podlagi dobljenih rezultatov bomo zbrali 20 pozitivnih, 40 slabo pozitivnih in 20 negativnih vzorcev. Te vzorce bomo nato testirali z ostalimi testi.

Dobljene rezultate bomo nato primerjali med seboj. Poskušali bomo ugotoviti, kateri izmed testov daje najzanesljivejše rezultate. Teste bomo med seboj primerjali tudi po načinu izvedbe, kakšna je zahtevnost izvedbe posameznega testa in koliko časa traja njegova izvedba.

3 MATERIALI IN METODE

Za analizo smo izbrali vzorce blata, ki so bili oddani v laboratorij v ustrezne posodice z lopatko za zbiranje blata. Iz teh posodic smo nato sami vzorčili blato po navodilih, ki so priložene vsakemu testu. Vzorce smo nato testirali z vsemi štirimi testi. Pri testih Hemocult[®], H&R FOB - Transferrin in ImmoCARE - C so vse potrebne stvari za izvedbo testa priložene, pri testu FOB Gold Sentinel pa smo potrebovali avtomatizirani kemijski analizator. Uporabili smo analizator Olympus AU640, na katerega smo metodo nastavili. Pri testu H&R FOB – Transferrin smo se odločili, da rezultat označimo kot pozitiven, kadar je prisoten Hb v blatu. V primeru, ko je v blatu prisoten samo transferin je rezultat negativen.

3.1 Izbira vzorcev

Zbirali smo vzorce naključnih pacientov. Potrebovali smo 80 vzorcev, od tega 20 negativnih, 40 slabo pozitivnih in 20 pozitivnih vzorcev. Vsak vzorec blata, ki je bil oddan v laboratorij, smo takoj testirali. Če je pacient prinesel vzorce treh zaporednih odvajanj, smo testirali vse tri. Vse vzorce smo najprej testirali s testom Hemocult[®] in glede na rezultate izločili 20 negativnih, 40 slabo pozitivnih in 20 pozitivnih. Le-te smo nato testirali še s testi H&R FOB - Transferrin, ImmoCARE - C in FOB Gold Sentinel.

3.2 Opis testov

3.2.1 Hemocult[®] test

Je hitri test za kvalitativno določitev FOB. Njegova analitična občutljivost je 0,3 mg Hb/g blata. Pomembno je, da pacienti natančno upoštevajo navodila, ki jih dobijo preden oddajo

vzorec. Pacient se mora držati teh navodil vsaj tri dni pred oddajo vzorca. Sedem dni prej in v času testne periode naj pacienti ne bi zaužili več kot 325 mg acetilsalicilne kisline na dan ali drugih protibolečinskih zdravil. Test je nespecifičen, saj lahko več substanc povzroči lažne pozitivne ali lažne negativne rezultate.

Lažne pozitivne rezultate lahko povzročijo:

- slabo kuhano ali rdeče meso;
- acetilsalicilna kislina več kot 325 mg/dan; drugi analgetiki, kot je ibuprofen ...;
- kortikosteroidi, antikoagulantni, kemoterapevtiki za rakava obolenja;
- alkohol v večjih količinah;
- aplikacija antiseptičnih preparatov, ki vsebujejo jod.

Lažno negativne rezultate lahko povzroči:

- askorbinska kislina (vitamin C) v odmerkih, večjih od 250 mg/dan.

Zavedati se moramo tudi, da nekatere črevesne lezije, kot tudi nekateri polipi in kolorektalni rak, vedno ne povzročajo krvavitve in tako kljub bolezni ne dobimo pozitivnega rezultata.

Princip testa

Test temelji na oksidaciji gvajaka s hidrogen peroksidom, kar povzroči modro obarvanje. Hem skupina iz molekule Hb ima, če je prisotna v blatu, peroksidazno aktivnost, ki katalizira oksidacijo alfa gvajak kisline, ki je aktivna sestavina gvajak papirja, s hidrogen peroksidom, kar povzroči modro obarvanost.

Zbiranje vzorcev in potek izvedbe testa

Za Hemocult[®] test potrebujemo malo količino blata. Vzorec blata pacient sam odvzame po navodilih. Odvzeti mora vzorce od treh zaporednih odvajanj.

Za izvedbo testa odpremo sprednjo stran testne kartice, kamor namažemo tanek sloj blata. Nato obrnemo testno kartico in na zadnjo stran kanemo dve kapljici reagenta direktno na vzorec blata in po eno kapljico na pozitivno ter negativno kontrolo. Že po desetih sekundah

interpretiramo rezultate kontrol. Da je test veljaven, se mora pozitivna kontrola obarvati modro, negativna pa ne. Za rezultate vzorca počakamo 60 sekund in šele nato interpretiramo rezultate. Pozitivni rezultat pomeni nastanek modre barve v okvirčku, kjer je vzorec.



Slika 3: Prikaz izvedbe testa Hemocult®



Slika 4: Slika prikazuje pozitivni in negativni rezultat pri testu Hemocult®

3.2.2 H&R FOB – Transferrin

Je hitra imunokromatografska metoda za kvalitativno določanje hHb in transferina v človeškem blatu. Meja detekcije tega testa je 40 µg hHb/g blata in 4 µg/L za transferin.

Princip metode

Je kvalitativna imunološka metoda, ki temelji na principu kapilarnega vleka ter je namenjena detekciji hHb in transferina v blatu. Vpojna blazinica, ki je vstavljena v ploščico, ima območje testne črte prekrito z monoklonskimi Pt proti hHb in proti transferinu. Po dodatku vzorca le-ta reagira z delci na vpojni blazinici, ki so prekrite z anti-hHb in anti-humanimi transferinskimi Pt. Raztopina potuje navzgor po vpojni blazinici po principu kapilarnega vleka. V primeru

pozitivnega rezultata bodo specifična Pt na vpojni blazinici reagirala z raztopino konjugata in povzročila nastanek obarvane črte v testnem polju. Zeleno obarvana črta se vedno prikaže v kontrolnem polju in služi kot notranja kontrola reagenta, kot dokaz, da je bila dodana zadostna količina vzorca in da je bil dosežen pravilen kapilarni vlek.

Zbiranje vzorca

Zbrati moramo zadostno količino vzorca blata (1–2 g ali mL za tekoče vzorce). Vzorec mora biti odvzet v čiste, suhe posodice, brez konzervansov ali transportnega medija. Pred uporabo se lahko vzorci hranijo največ 1–2 dni v hladilniku (2–4⁰ C). Če želimo vzorec hraniti dalj časa, ga moramo zamrzniti na - 20⁰ C in ga potem pred uporabo odmrzniti ter počakati, da doseže sobno temperaturo.

Priprava vzorca in postopek izvedbe testa

Za vsak vzorec moramo uporabiti novo epruveto za odvzem, ekstrakcijo in nanos vzorca. Odvijemo zamašek in konec paličice, ki je pritrjen na zamašek, potopimo v blato na treh mestih (odvzeti moramo od 50 do 100 mg vzorca). Pri tekočih vzorcih blata, aspiriramo vzorec s kapalko in nato dodamo 50–100 µL v stekleničko s pufrom. Zamašek z vzorcem vstavimo nazaj v epruveto in ga tesno privijemo. Nato epruveto z vzorcem in pufrom dobro premešamo.

Pred pričetkom izvajanja testa morajo testna ploščica, blato in epruvete s pufrom doseči sobno temperaturo. Ovoja testne ploščice ne smemo odpirati preden ne začnemo z izvedbo testa. Izvedba testa poteka po naslednjem vrstnem redu:

- odstranimo ovoj s testne ploščice in jo uporabimo takoj, ko je mogoče;
- dobro premešamo epruveto z vzorcem in pufrom. Odlomimo konico epruvete;
- v vzorčno polje (S) dodajte točno pet kapljic ali 150 µL;
- rezultat odčitamo po desetih minutah.

Interpretacija rezultatov

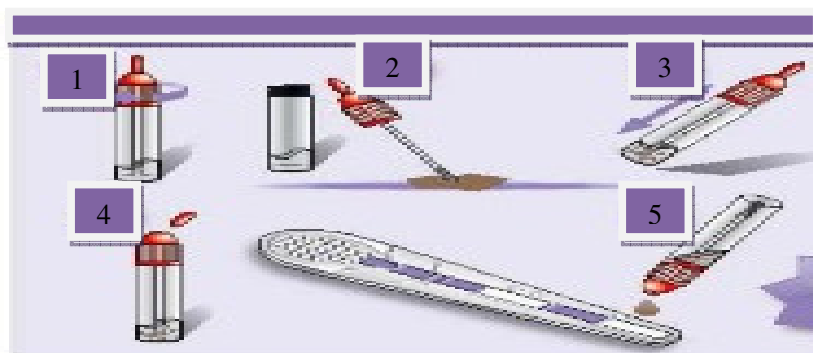
Pozitivni rezultat za Hb je takrat, kadar se pojavita dve črti. Pojaviti se mora kontrolna zelena črta in modra črta na sredini okenca. Pozitivni rezultat za transferin je takrat, kadar se pojavi

kontrolna zelena črta in rdeča črta za transferin na začetku okenca. Če se pojavijo vse tri črte, sta v vzorcu blata prisotna tako Hb kot transferin.

Negativni rezultat je takrat, kadar se pojavi samo zelena kontrolna črta.

Neveljaven rezultat pa je, kadar se ne pojavi zelena kontrolna črta. Za to je lahko več vzrokov, kot npr. premalo vzorca, nepravilen postopek izvajanja testa ali razpad reagenta.

Intenziteta rdeče črte za transferin in modre črte za Hb je odvisna od koncentracije transferina oz. Hb v vzorcu blata.



Slika 5: Slika prikazuje postopek izvedbe testa H&R FOB – Transferrin.

3.2.3 ImmoCARE – C

Hiter kromatografski test za kvalitativno detekcijo hHb v blatu. Test mora biti shranjen na temperaturi 4–28⁰ C. Vzorec blata pacient zbere sam po navodilih. Vzorci se morajo hraniti v hladilniku (4–8⁰ C) in morajo biti testirani v roku petih dni. Analitična občutljivost testa je 50 µg Hb/L, kar je 0,03 mg Hb/g blata.

Princip testa

Po aplikaciji vzorca se le-ta po principu kapilarnega vleka pomakne do blazinice, ki je prekrita z delci koloidnega zlata, na katera so vezana Pt proti hHb. V primeru, da je v vzorcu blata

prisoten hHb, se le-ta veže z anti- β -hHb Pt, vezanimi na delcih koloidnega zlata. Ta kompleks potem potuje do linije, na kateri so imobilizirana anti- α -hHb Pt, kjer se ob prisotnosti hHb pojavi rožnata črta na mestu T. Kot notranja pozitivna kontrola so na blazinico, prekrito z delci koloidnega blata, vezana tudi druga Pt, ki se neodvisno od prisotnosti hHb v vzorcu blata premaknejo do drugih Pt. Dobimo rožnato črto na kontrolni liniji, ki nam služi kot kontrola za pravilno izvedbo testa.

Postopek izvedbe testa

- Vzorec mora imeti temperaturo med 20 in 25⁰ C.
- Odstranimo ovoj iz testne kasete tik preden pričnemo s testom.
- Pretresemo epruveto s pufrom. S staničevino pokrijemo pokrovček epruvete in ga odlomimo.
- Kapnemo dve kapljici iz epruvete v vzorčno polje (S) in se izognemo mehurčkom.
- Počakamo pet minut in interpretiramo rezultat.

Interpretacija rezultatov

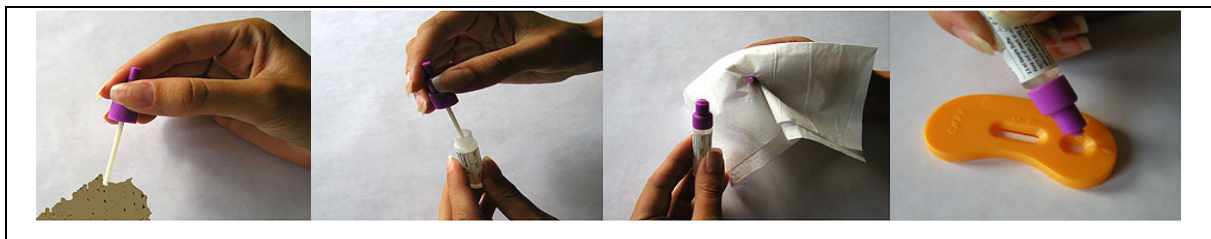
Test je pozitiven, če se pojavita dve rožnati črti v okencu. Ena je kontrolna črta na mestu C, druga pa pomeni prisotnost Hb v vzorcu blata in se pojavi na mestu T.

Test je negativen, če se pojavi samo kontrolna črta na mestu C.

Test je neveljaven, če se ne pojavi nobena črta, ali če se celotno okno obarva rožnato.

Če so po petih minutah vidne slabo obarvane črte, počakamo še pet minut in interpretiramo rezultat. Če so črte še vedno slabo vidne, se mora uporabiti nova testna kaset.

Negativni test še ne izključi bolezni, prav tako moramo pozitiven test še enkrat ponoviti. Prav tako je lahko pozitiven rezultat lažen, saj lahko lažno pozitiven rezultat povzročijo različne snovi, ki lahko povzročijo krvavitve gastrointestinalnega trakta. Te so: acetilsalicilna kislina, glukokortikoidi, ne steroidni antirevmatiki, derivati kumarina ...



Slika 6: Slika prikazuje izvedbo testa ImmoCARE – C.

3.2.4 FOB Gold Sentinel

FOB Gold test omogoča kvantitativno določitev hHb v blatu. Metoda se nastavi na avtomatiziran analizator in se uporablja za detekcijo številnih bolezni spodnjega dela gastrointestinalnega trakta. Občutljivost metode je 14 $\mu\text{g/L}$ (2,38 $\mu\text{g/g}$ blata).

Metodo smo nastavili na analizator Olympus AU640. To je analizator, ki optično meri sestavine v vzorcu. Najprej vzorec dispergira in nato doda reagent. Po mešanju vzorca z reagentom sistem meri absorbanco vzorca.

Princip metode

FOB Gold test je imunodiagnostični kit, ki daje občutljive in natančne rezultate hHb v vzorcu blata. Temelji na principu vezave Ag–Pt in nastanka aglutinacije med hHb iz vzorca ter poliklonalnimi Pt proti hHb, ki so absorbirana na polistirenske delce. Takšno aglutinacijo merimo kot porast absorbance pri 570 nm in je proporcionalna koncentraciji hHb v vzorcu.

Vzorčenje

Test ima priložene testne epruvete, ki vsebujejo raztopino pufru za ekstrakcijo Hb in shranjevanje. Testna epruveta ima na eni strani vijoličast zamašek, na katerega je pritrjena ščetka, ki jo moremo potopiti v vzorec blata na treh različnih mestih in jo nato zaviti nazaj. Nato moramo testno epruveto pustiti stati 60 minut z vijoličnim zamaškom navzgor, da se vzorec raztopi v pufer. Testna epruveta z vzorcem je stabilna en teden pri temperaturi 2–8⁰ C in zaščitena pred svetlobo.

Nastavitev metode in izvedba testa

Za izvedbo metode potrebujemo kalibrator, kontrolo in reagente. Najprej moramo metodo vnesti v analizator po navodilih, ki jih dobimo od proizvajalca. Nato moramo pripraviti reagente. Priložena sta dva reagenta, ki ju moramo hraniti v hladilniku. Reagent 1 je pufer s pH 8. Reagent 2 pa je raztopina z lateksnimi delci, pokritimi s poliklonalnimi protitelesi proti hHb s pH vrednostjo 8. Oba reagenta sta pripravljena za uporabo. Odprta sta stabilna 60 dni pri temperaturi 2–8°C.

Ko smo metodo nastavili in vstavili reagente, jo moramo tudi kalibrirati. Priložen imamo kalibrator, ki vsebuje hHb v koncentraciji približno 1000 ng/mL. Pred uporabo je potrebno kalibrator pripraviti. Doseči mora sobno temperaturo. Nato odstranimo pokrovček in dodamo 2 mL destilirane vode ter počakamo 10 minut, da se popolnoma raztopi. Potem lahko kalibrator uporabimo.

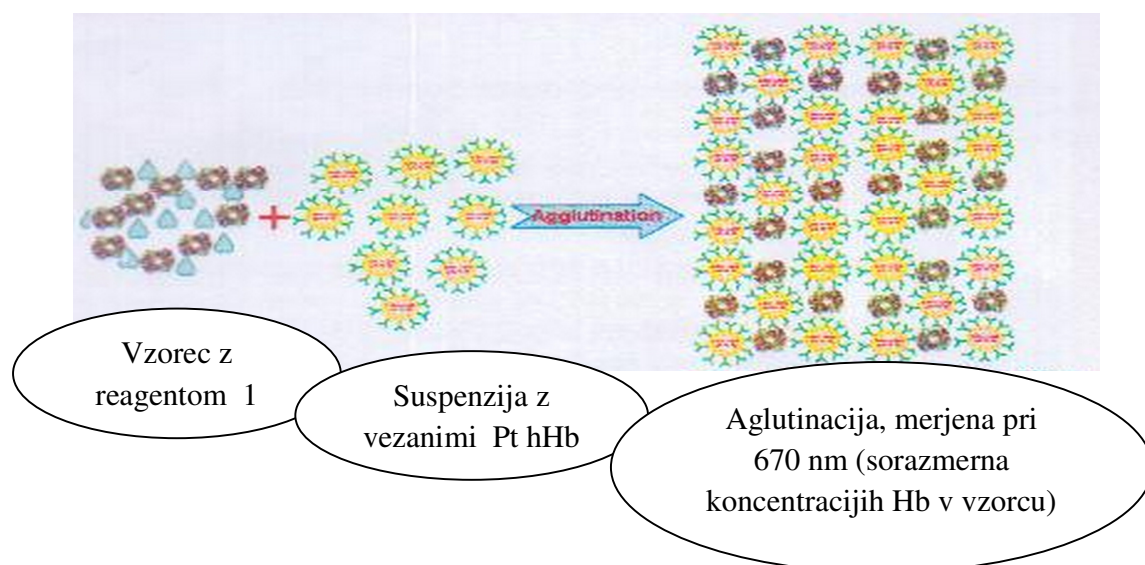
Na avtomatiziranem kemijskem analizatorju Olympus AU640 smo naredili pettočkovno kalibracijo (kalibrator, redčitev 1 : 2, redčitev 1 : 4, redčitev 1 : 8 in redčitev 1 : 16). Stabilnost kalibracije na avtomatskem analizatorju je najmanj štiri tedne.

Ko imamo metodo kalibrirano in vstavljena oba reagenta, lahko pričnemo z analizo kontrol. Priloženi imamo dve kontroli, ki ju moramo pred uporabo še pripraviti. Počakati moramo, da se segrejejo na sobno temperaturo, nato odpremo pokrovček in dodamo 2 mL destilirane vode in počakamo 10 minut, da se popolno raztopijo.

Preden začnemo analizirati vzorce, moramo preveriti še kontrolo. Obe kontroli morata biti znotraj določenega območja, preden lahko analiziramo vzorce, drugače rezultati niso veljavni.

Interpretacija rezultatov

Analizator nam poda številčni rezultat. Sami moramo nato, glede na postavljeno mejno vrednost, opredeliti rezultat kot pozitiven oz. negativen.



Slika 7: Prikazan je princip testa FOB Gold Sentinel.

3.3 Statistična obdelava rezultatov

Za statistično obdelavo rezultatov smo uporabili program Analyse – it. Test, ki smo ga izvedli, je Agreement – Kappa test o ujemanju metod. Pri testu se postavi hipoteza, da se testa ne ujemata, ki se nato potrди ali ovrže. Kot rezultat dobimo k , ki predstavlja dobro ali slabo ujemanje metod. Ujemanje metod je dobro, če je $k > 0,75$ in ujemanje metod je slabo, če je $k < 0,4$. Uporabili smo 95 % interval zaupanja.[20]

Da smo lahko dobljene rezultate statistično obdelali smo morali vse rezultate opredeliti kot pozitivne (1) in negativne (0). Pri testu Hemocult[®] smo zato vse slabo pozitivne rezultate opredelili kot negativne. Tudi pri testu FOB Gold Sentinel smo vse rezultate, glede na mejno vrednost, opredelili kot pozitivne in negativne. Vse rezultate smo nato na podlagi testa Hemocult[®] razvrstili po vrsti, najprej v negativne in nato v pozitivne. Zaradi tega so se spremenile začetne številke vzorcev.

4 REZULTATI

Tabela 1: Osnovni rezultati, dobljeni po opravljenih testih. Opredeljeni so kot: negativni (0), slabo pozitivni (1) in pozitivni (2).

Št.	Hemocult	FOB - Transferrin	ImmoCARE	Sentinel Olympus (µg/L)
1	0	0	0	4,6
2	0	1	0	2,9
3	0	0	0	2,4
4	0	0	0	0,4
5	0	0	0	1,4
6	0	0	0	9,8
7	0	0	0	0
8	0	1	1	86,0
9	0	0	0	2,1
10	0	0	0	0,1
11	0	0	0	0,9
12	0	0	0	1,6
13	0	0	0	0,1
14	0	0	0	0,6
15	0	0	0	4,1
16	0	0	0	1,6
17	0	0	0	3,9
18	0	0	0	1,9
19	0	0	0	1,4
20	0	0	0	0,9
21	1	0	0	1,6
22	1	1	1	108,3

23	1	0	0	1,1
24	1	1	0	1,1
25	1	0	0	1,9
26	1	0	0	0,1
27	1	0	0	2,1
28	1	1	1	57,0
29	1	0	0	1,4
30	1	1	1	380,1
31	1	0	0	5,1
32	1	1	1	96,0
33	1	0	0	40,9
34	1	0	0	11,6
35	1	0	0	15,9
36	1	0	0	2,1
37	1	0	0	34,7
38	1	0	0	3,6
39	1	0	0	0,4
40	1	0	0	2,1
41	1	0	0	1,6
42	1	1	1	544,5
43	1	0	0	32,0
44	1	0	0	2,1
45	1	0	0	2,4
46	1	0	0	0
47	1	0	0	0,6
48	1	0	0	5,8
49	1	0	0	4,9
50	1	0	0	10,8
51	1	0	0	0
52	1	0	0	0,9
53	1	0	0	0

54	1	0	0	0
55	1	0	0	0,1
56	1	1	1	2,6
57	1	0	0	2,6
58	1	0	0	0
59	1	0	0	0
60	1	0	0	0
61	2	0	0	3,4
62	2	1	1	3397,0
63	2	1	1	3673,0
64	2	0	0	2,4
65	2	1	1	315,0
66	2	0	0	0,1
67	2	1	1	4,9
68	2	0	0	2,9
69	2	1	1	411,3
70	2	1	0	827,7
71	2	1	1	4498,8
72	2	0	0	1,4
73	2	0	0	0,4
74	2	0	0	2,6
75	2	1	1	1921,7
76	2	0	1	10332,3
77	2	0	0	9,3
78	2	0	1	818,0
79	2	0	0	88,1
80	2	0	0	1,6

Tabela 2: Prirejeni rezultati za statistično obdelavo. Rezultati opredeljeni na negativne (0) in pozitivne (1).

Št. (*)	Hemocult (0,1,2)	Hemocult (0, 1)	FOB - Transferrin	ImmoCARE	Sentinel cut-off 100 (µg/L)	Sentinel cut-off 50 (µg/L)
1(1)	0	0	0	0	0	0
2(2)	0	0	1	0	0	0
3(8)	0	0	0	0	0	0
4(9)	0	0	0	0	0	0
5(10)	0	0	0	0	0	0
6(11)	0	0	0	0	0	0
7(12)	0	0	0	0	0	0
8(13)	0	0	1	1	0	1
9(14)	0	0	0	0	0	0
10(15)	0	0	0	0	0	0
11(17)	0	0	0	0	0	0
12(19)	0	0	0	0	0	0
13(20)	0	0	0	0	0	0
14(21)	0	0	0	0	0	0
15(22)	0	0	0	0	0	0
16(23)	0	0	0	0	0	0
17(24)	0	0	0	0	0	0
18(25)	0	0	0	0	0	0
19(26)	0	0	0	0	0	0
20(27)	0	0	0	0	0	0
21(28)	1	0	0	0	0	0
22(30)	1	0	1	1	1	1
23(31)	1	0	0	0	0	0
24(33)	1	0	1	0	0	0
25(36)	1	0	0	0	0	0
26(37)	1	0	0	0	0	0

27(38)	1	0	0	0	0	0
28(44)	1	0	1	1	0	1
29(46)	1	0	0	0	0	0
30(47)	1	0	1	1	1	1
31(48)	1	0	0	0	0	0
32(49)	1	0	1	1	0	1
33(51)	1	0	0	0	0	0
34(52)	1	0	0	0	0	0
35(53)	1	0	0	0	0	0
36(56)	1	0	0	0	0	0
37(57)	1	0	0	0	0	0
38(58)	1	0	0	0	0	0
39(59)	1	0	0	0	0	0
40(60)	1	0	0	0	0	0
41(61)	1	0	0	0	0	0
42(62)	1	0	1	1	1	1
43(63)	1	0	0	0	0	0
44(64)	1	0	0	0	0	0
45(65)	1	0	0	0	0	0
46(66)	1	0	0	0	0	0
47(67)	1	0	0	0	0	0
48(68)	1	0	0	0	0	0
49(69)	1	0	0	0	0	0
50(70)	1	0	0	0	0	0
51(71)	1	0	0	0	0	0
52(72)	1	0	0	0	0	0
53(73)	1	0	0	0	0	0
54(74)	1	0	0	0	0	0
55(75)	1	0	0	0	0	0
56(76)	1	0	1	1	0	0
57(77)	1	0	0	0	0	0

58(78)	1	0	0	0	0	0
59(79)	1	0	0	0	0	0
60(80)	1	0	0	0	0	0
61(3)	2	1	0	0	0	0
62(4)	2	1	1	1	1	1
63(5)	2	1	1	1	1	1
64(6)	2	1	0	0	0	0
65(7)	2	1	1	1	1	1
66(16)	2	1	0	0	0	0
67(18)	2	1	1	1	0	0
68(29)	2	1	0	0	0	0
69(32)	2	1	1	1	1	1
70(34)	2	1	1	0	1	1
71(35)	2	1	1	1	1	1
72(39)	2	1	0	0	0	0
73(40)	2	1	0	0	0	0
74(41)	2	1	0	0	0	0
75(42)	2	1	1	1	1	1
76(43)	2	1	0	1	1	1
77(45)	2	1	0	0	0	0
78(50)	2	1	0	1	1	1
79(54)	2	1	0	0	0	1
80(55)	2	1	0	0	0	0

(*)začetna številka vzorca

Tabela 3: Kappa koeficienti, dobljeni s statistično obdelavo rezultatov v programu Analyse - it[®].

KAPPA TEST ($k \neq 0$) IZ = 95% *	Hemoccult	FOB - Transferrin	ImmoCARE	Sentinel 50	Sentinel 100
Hemoccult		0,29 (0,02 – 0,50)*		0,43 (0,20 – 0,66)*	
FOB - Transferrin			0,81 (0,65 – 0,97)*		0,62 (0,40 – 0,84)*
ImmoCARE	0,36 (0,12 – 0,59)*			0,84 (0,70 – 0,99)*	
Sentinel 50		0,73 (0,55 – 0,92)*			
Sentinel 100	0,46 (0,23 – 0,69)*		0,74 (0,55 – 0,94)*		

*interval zaupanja; ()*meje zaupanja;

5 RAZPRAVA

Ker ni referenčne metode, smo se za izhodišče vzeli rutinsko metodo z gvajak smolo. V našem primeru je to test Hemocult[®]. Opazimo lahko, da se rezultati med seboj pogosto ne ujemajo. Največje razlike opazimo pri testu Hemocult[®], medtem ko se rezultati testov ImmoCARE - C in FOB Gold Sentinel med seboj dobro ujemajo. Vzrok za ujemanje ni znan, verjetno pa je v dejstvu, da obe metodi temeljita na imunokemijskem mehanizmu. Razlike v rezultatih se pri testu Hemocult[®] pojavijo predvsem pri slabo pozitivnih rezultatih. Vzrok je najverjetneje v nespecifičnosti testa Hemocult[®]. Pozitiven rezultat je lahko vzrok številnih snovi, ki jih dobimo s prehrano in zdravili ter se potem izločijo z blatom. Pred testiranjem je zato potrebno paciente poučiti o dieti, ki jo morajo držati pred in med testiranjem. Specifičnost testa izboljšamo tudi s testiranjem vzorcev treh zaporednih odvajanj, kar se tudi uporablja v praksi. Nekatere študije so dokazale, da dieta ni potrebna. Potencialnim interferencam zaradi rastlinskih peroksidaz se lahko izognemo tako, da vzorec blata na testnem lističu sušimo 48 ur preden ga analiziramo.[13] Reakcija testa poteče v mešanici blata, gvajanske kisline in razvijalca, ki temelji na etanolu in vsebuje H₂O₂. Večja kot je koncentracija etanola v tej mešanici, večja je verjetnost, da bo proteinski del rastlinskih peroksidaz denaturiral in tako je malo verjetno, da bi lahko rastlinske peroksidaze še vplivale na rezultat. Ker je koncentracija etanola v mešanici odvisna od koncentracije etanola v razvijalcu in od vsebnosti vode v blatu, je tako manjša možnost, da bi rastlinske peroksidaze vplivale na rezultat, če blato posušimo preden dodamo razvijalec.[16] Vendar je to v praksi težko doseči. Prišlo bi do številnih problemov, če bi vsak vzorec blata nanесли na testno okence in ga potem pustili stati 48 ur preden bi ga analizirali. Posledica bi bila tudi daljša čakalna doba na rezultate testa. Pri testih, kot je Hemocult[®], ki temeljijo na peroksidazni aktivnosti hema, pa lahko dobimo tudi lažno negativne rezultate. Ker Hb v blatu ni stabilen, se lahko rezultati spremenijo, če vzorca ne testiramo pravi čas. Ker je peroksidazna aktivnost hema odvisna od prisotnosti Fe atoma v porfirinskem obroču, se pri odlašanjem analize v vlažni posodici, kjer je blato shranjeno, poveča možnost degradacije hema z odstranitvijo Fe atoma. To povzroči lažne negativne rezultate.[15] Zato je potrebno blato testirati takoj, ko prispe v laboratorij oziroma najkasneje v dveh urah.

Izvedba testa je prav tako pomembna kadar želimo določen test oceniti. Idealno je, če ima test lahko in hitro izvedbo z enostavno interpretacijo ter daje zanesljive rezultate. Vendar se moramo zavedati, da ima vsak test svoje prednosti in pomanjkljivosti. Pri testih, ki smo jih uporabili za analizo blata, po izvedbi izstopa samo kvantitativni test FOB Gold Sentinel. Ker je pri njem potrebna uporaba avtomatiziranega kemijskega analizatorja, so stvari v začetni fazi bolj zapletene. Da lahko metodo nastavimo na analizator, moramo znati z analizatorjem ravnati. Test Sentinel se lahko nastavi na številne analizatorje, prav tako pa so proizvajalci razvili tudi poseben analizator samo za to preiskavo. Če uporabimo analizator, na katerem se lahko izvede več preiskav, je vedno prisotna možnost kontaminacije z drugimi snovmi, ki smo jih analizirali, kar je lahko slabost takšnega večnamenskega analizatorja. Pri delu z analizatorjem je vedno potrebno skrbeti za reagente, kontrole in kalibratorje, da so shranjeni po navodilih proizvajalca in da jih ne uporabljamo po preteku roka uporabe. Če imamo z analizatorjem izkušnje oz. ko se naučimo z njim ravnati, je naše delo preprosto. Pri testu Sentinel moramo samo nastaviti metodo in nato odvzeti vzorce blata v priložene epruvete. Analizator lahko nato v kratkem času analizira veliko število vzorcev. Vso nadaljnjo delo opravi analizator, ki nam poda natančne številčne rezultate. Testa H&R FOB – Transferrin in ImmoCARE - C imata enako hitro in preprosto izvedbo z enostavno interpretacijo rezultatov. Za izvedbo teh testov ne potrebujemo veliko izkušenj, slediti moramo samo navodilom proizvajalca, ki so priložena. Pri obeh testih nam proizvajalec natančno opiše izvedbo in tudi interpretacijo rezultatov. Test Hemoccult[®] je edini od uporabljenih testov, ki temelji na peroksidazni aktivnosti hema in nam kot rezultat poda spremembo barve. Izvedba testa je zelo enostavna, vendar se pojavijo problemi pri interpretaciji rezultatov. Ker sprememba barve ni vedno tipična, je lahko interpretacija za neizkušeno osebo zelo težavna. Včasih je zelo težko določiti, ali je rezultat pozitiven ali ne. Razlike v rezultatih pri testu Hemoccult[®] v primerjavi z ostalimi testi so lahko tudi zaradi slabe interpretacije rezultatov, saj je razvidno, da je preveč slabo pozitivnih rezultatov. Študija je dokazala, da je pri gvajak testih prišlo do številnih napak predvsem zaradi interpretacije rezultatov.[13]

Pomembna razlika med testi za odkrivanje prisotnosti okultne krvi v blatu je tudi analitična občutljivost testov. Pomembno je, da test ni preobčutljiv, saj nastane problem lažno pozitivnih rezultatov, prav tako pa test ne sme biti premalo občutljiv, saj bi tako zgrešili številna rakava

obolenja kolorektalnega trakta. Prag Hb se mora določiti tako, da se poveča specifičnost testa in zmanjša število lažno pozitivnih rezultatov. Za določitev mejne vrednosti se upoštevajo tudi stroški določenih testov in dostop do kolonoskopije.[14] Pri primerjavi testov nastane problem pri različnih mejnih vrednostih, ki jih določijo proizvajalci. Te vrednosti so v različnih merskih enotah, kar oteži primerjavo. Pri kvalitativnih imunokemijskih testih so velikokrat mejne vrednosti, ki jih določi proizvajalec, zelo nizke. Večina kvalitativnih testov ima mejno vrednost enako analitični občutljivosti, ki jo določi proizvajalec. Posledica nizkih mejnih vrednosti so nato lažno pozitivni rezultati. Prednost kvantitativnih imunokemijskih testov je, da v nasprotju s kvalitativnimi testi tukaj analitična občutljivost in mejna vrednost nista enaki. To je velika prednost testa FOB Gold Sentinel. Proizvajalec nam poda analitično občutljivost testa, mejno vrednost pa samo priporoči, določimo pa si jo lahko sami. Mi smo se zaradi pomanjkanja izkušenj pri analizi nanašali na priporočljive mejne vrednosti, zato smo vzeli tako 50 µg/L in tudi 100 µg/L. Iz rezultatov statistične obdelave je razvidno, da se najbolje ujemata metodi ImmoCARE - C in FOB Gold Sentinel, ko smo vzeli mejno vrednost 50 µg/L. Vzrok je najverjetneje v enakih mejnih vrednostih, saj ima ImmoCARE - C analitično občutljivost in tako tudi mejno vrednost 50 µg/L. Rezultati testa se ne spremenijo veliko, če se spremeni mejna vrednost na 100 µg/L, vendar se spremeni oz. zmanjša ujemanje z drugimi testi. V tem primeru imajo ostali testi večjo občutljivost in dajo več pozitivnih rezultatov. Razvidno iz rezultatov je tudi, da so ujemanja med imunokemijskimi testi boljša kot z gvajak testom. Za razliko od kvantitativnih imunokemijskih testov je izvedba kvalitativnih enako enostavna kot pri gvajak testih. Vendar se razlike pojavijo tudi med kvalitativnimi imunokemijskimi testi. Razlike so v protitelesih, ki jih uporabljajo posamezni testi in predvsem v različnih analitičnih občutljivostih testov oziroma v različnih mejnih vrednostih.[11]

Po pregledu rezultatov smo za pozitivne in slabo pozitivne vzorce pregledali podatke o diagnozah, ki bi lahko bile vzrok za pojav krvi v blatu, vendar vseh podatkov nismo našli. Pri vzorcih 4, 42, 49 in 50 smo našli diagnoze, ki so lahko vzrok za pojav krvavitve v blatu. Pri vzorcih 4 in 42 smo pri vseh testih dobili pozitiven rezultat. Vzrok za pozitiven rezultat pri pacientu z vzorcem 4 je lahko postavljena diagnoza hemoroidalna bolezen in polipi v rektumu, pri pacientu z vzorcem 42 pa diagnoza kronična vnetna črevesna bolezen. Pacientu z vzorcem

49 so postavili diagnozo karcinom sigme, pri analizi blata pa smo dobili različne rezultate. Test Hemocult® je pokazal slabo pozitiven rezultat, testa H&R FOB – Transferrin in ImmoCARE - C sta bila pozitivna, test FOB Gold Sentinel pa je bil pri mejni vrednosti 50 µg/L pozitiven, pri mejni vrednosti 100 µg/L pa negativen. Če bi vzorec 49 analizirali samo s testom FOB Gold Sentinel, bi pri mejni vrednosti 100µg/L spregledali karcinom. Tudi pri vzorcu 50 vsi rezultati niso bili enaki. Testi Hemocult®, ImmoCARE - C in FOB Gold Sentinel so bili pozitivni, test H&R FOB – Transferrin je bil negativen, pacientu pa so postavili diagnozo divertikli debelega črevesa, kar je lahko vzrok za pojav krvi v blatu. Vzroka za negativen rezultat pri testu FOB – Transferrin v tem primeru ne poznamo, lahko, da je prišlo do kakšnih napak pri sami izvedbi testa.

Pri analizi je težko reči, katera metoda je najzanesljivejša. Za oceno metode je potrebno upoštevati več stvari. Najpomembneje je seveda, da metoda daje zanesljive rezultate, vendar se upoštevajo tudi stroški metode in njena izvedba. Pri primerjavi metod bi lahko rekli, katera daje dobre rezultate samo v primeru, da bi se pacienti podvrgli tudi kolonoskopiji, ki bi dokončno potrdila ali ovrgla dobljene rezultate testov. Študije so dokazale, da so kvalitativni imunokemijski testi opcija za prihodnost, saj imajo boljšo specifičnost in enako ali celo lažjo izvedbo, kot gvajak testi.[11] Prednosti imunokemijskih testov pred gvajak testi naraščajo, vendar je še vedno potrebno določiti, kateri imunokemijski test je najboljši.[12] James E Allison je dejal, da noben test ni perfekten, vendar je katerikoli boljši kot nobeden.[19] Napačno bi bilo verjeti, da bo en test za odkrivanje kolorektalnega karcinoma vedno odkril vse spremembe kolorektalnega trakta. Pripravljeni moramo biti na to, da bomo zaradi različnih faktorjev kakšno spremembo tudi spregledali.

6 SKLEPI

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, katera metoda za določanje FOB daje najzanesljivejše rezultate in ima enostavno izvedbo.

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo naslednje:

- iz dobljenih rezultatov ne moremo določiti, katera metoda daje najzanesljivejše rezultate. Za to bi potrebovali tudi rezultate kolonoskopije, ki bi nam potrdila ali ovrgla rezultate, dobljene s testi;
- glede na rezultate, ki smo jih dobili s statistično obdelavo, lahko rečemo, da so rezultati testa Hemocult[®] najslabši. Rezultati dobljeni s testom Hemocult[®] se slabo ujemajo z rezultati, dobljenimi z drugimi testi;
- sklepamo lahko, da se veliko pacientov ne drži diete, ki je potrebna pred in med testiranje s testom Hemocult[®]. Veliko vzorcev, ki je dalo pozitiven rezultat ali sled pri testu Hemocult[®], je bilo negativnih pri ostalih testih;
- interpretacija rezultatov pri testu Hemocult[®] je zelo težavna. Podajanje rezultatov kot sled bi se moralo omejiti ali celo ukiniti, saj je pri drugih testih razvidno, da je sled pri testu Hemocult[®] v večini primerov najverjetneje posledica interferenc;
- kvalitativna imunokemijska testa ImmoCARE – C in H & R FOB – Transferrin imata zelo lahko in hitro izvedbo ter enostavno interpretacijo. Test FOB Gold Sentinel ima prednost, saj dobimo kvantitativni rezultat, vendar je njegova izvedba zahtevnejša;
- uporaba imunokemijskih testov ima številne prednosti pred gvajak testi. Zaključimo lahko, da je prehod iz gvajak testov na imunokemijske teste potreben.

7 LITERATURA

1. Dr. Marjan Pocajt, dr. Anton Širca: Anatomija in fiziologija za medicinske šole; Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1990: 63 – 101, 122 – 29.
2. E. Pirelleux, B. Anselme, D. Richard: Biologija človeka – anatomija, fiziologija, zdravje; Nathan in DZS d.d., Pariz, 1999: 83 – 7, 162 – 70.
3. Klinike Reiner, Stefan Silbernagel: Lerbuch der Physiologie 4th; Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York, 2003: 190 – 7, 711.
4. Carl A. Bruits, Edward R. Ashwood, David E. Bruns: TIETZ Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostic; Elsevier Saunders, USA, 2006: 52, 1165 – 70, 1224.
5. Max Schneider: Einführung in die Physiologie des Menschen; Springer – Verlag, Berlin – Heidelberg – New York, 1971: 30 – 41.
6. Ivica Avberšek – Lužnik: Priporočeni postopki za laboratorijske preiskave blata; Slovensko združenje za klinično kemijo, Ljubljana: 2000: 4.4.
7. Lothar Thomas: Labor und Diagnose – Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, 6. Auflage; TH – Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, 2005: 660 – 4.
8. Seminar za tehnike laboratorijske medicine – Zbornik predavanj; Čateške toplice, Jesenice, Ljubljana, Ptuj, Sežana; Oktobr – november, 1999, II.
9. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Kri>.
10. http://www.chemistry.wustl.edu/~courses/genchem/tutorials/Hemoglobin/hemo_6.htm
11. Sabrina Hundt, Ulrike Hang, Herman Brunner: Comparative Evaluation of Immunochemical Fecal Occult Blood Tests for Colorectal Adenoma Detection; Ann Intern Med, 2009; 150: 162 – 9.
12. J. S. Mendel: Which Colorectal Cancer Screening Test Is Best?, J Natl Cancer Inst, October 3, 2007; 99(19): 1424 – 1425.
13. Callum G. Fraser: Faecal occult blood tests – eliminate, enhance or update?; Ann Clin Biochem 2008; 45: 117 – 121.

14. Levi Z., Rozen P, Hazazi R.:a Quantitative Immunochemical Fecal Occult Blood Tes for Colorectal Neoplasia; Ann Intern Med 2007; 146: 244 – 55.
15. Joung GP, Sinatra MA, St. John DJ: Influence of Delay in Stool Sampling on Fecal Occult Blood Test Sensitivity; Clin Chem 1996; 42: 1107 – 8.
16. Sinatra MA, St. John DJ, Young GP: Interferenc of Plant Peroxidases with Guaiac – based Fecal Occult Blood Tests Is Avoiable; Clin Chem 1999; 45: 123 – 6.
17. L. Guittet, V. Bouvier, N. Mariotte, JP Vallee D. Arsene, S. Boutreux, J Tichet, G Launoy: Comparison of guaiac based and an immunochemical faecal occult blood test in screening for colorectal cancer in a general average risk population; Gut 2007; 56: 210 – 14.
18. Collins JF, Librman DA, Durbin TE, Weiss DG: Accuracy of Screening for Fecal Occult Blood on a Single Stool Sample Obtained by Digital Rectal Examination: A Comparison with Recommended Sampling Practice; Ann Intern Med 2005; 142: 81 – 85.
19. James E Allison: Screening Test for Colorectal Cancer – No Test is Perfect but Any Test is Better than None; US Gastroenterology Review 2006; 1 – 3.
20. Mathews DE, Farewell VT: Using and understanding medical Statistic, 4th completely revised and anlarged deition; Kaeger 2007, 303 – 9.