

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SANDRA ŠIMUNIĆ

DIPLOMSKA NALOGA

Visokošolski strokovni program
Laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SANDRA ŠIMUNIĆ

**PRIMERJAVA DIAGNOSTIČNE UPORABNOSTI REZULTATOV
KVALITATIVNE IN KVANTITATIVNE METODE ZA DOLOČANJE
PRIKRITE KRVAVITVE V BLATU**

**COMPARISON OF DIAGNOSTIC APPLICATIONS OF RESULTS
FROM QUALITATIVE AND QUANTITATIVE METHOD FOR
DETERMINATION OF CONCEALED BLOOD IN FAECES**

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm.spec. med. biokem., in somentorstvom mag. Elizabete Božnar Alič, spec. med. biokem.

Praktični del sem v celoti opravila na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo, v Laboratoriju za analitiko specialnih telesnih tekočin v Ljubljani.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm. spec. med. biokem., in somentorice mag. Elizabete Božnar Alič, univ. dipl. biolog., spec. med. biokem.

Sandra Šimunić

Zahvala

Zahvaljujem se prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm. spec. med. biokem. za pomoč in smernice pri nastanku diplomske naloge.

Zahvaljujem se somentorici mag. Elizabeti Božnar Alič, univ. dipl. biolog., spec. med. biokem., ki me je vodila skozi praktični del diplomske naloge in mi pomagala pri pisanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi staršem in prijateljem, ki so mi v vseh letih študija stali ob strani in me podpirali.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: izr. prof. dr. Irena Mlinarič Raščan

Mentor: prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm. spec. med. biokem.

Somentorica: mag. Elizabeta Božnar Alič, univ. dipl. biolog., spec. med. biokemije

Član: doc. dr. Simon Žakelj mag. farm.

KAZALO

POVZETEK.....	IV
ABSTRACT.....	VI
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VII
SEZNAM SLIK.....	IX
SEZNAM PREGLEDNIC.....	X
SEZNAM ENAČB.....	XI
1. UVOD.....	1
1.1 KRI.....	1
1.2 ZGRADBA IN DELOVANJE ERITROCITOV.....	1
1.2.1 RAZGRADNJA ERITROCITOV.....	3
1.3 ŽELEZO.....	4
1.3.1 PRESNOVA ŽELEZA.....	4
1.3.2 IZGUBE ŽELEZA.....	4
1.3.3 ABSORPCIJA ŽELEZA.....	5
1.3.4 KONCENTRACIJA FERITINA V SERUMU IN ZASIČENJE TRANSFERINA Z ŽELEZOM.....	6
1.3.5 ANEMIJA ZARADI POMANJKANJA ŽELEZA.....	6
1.4 PREBAVILA.....	7
1.4.1 USTNA VOTLINA.....	8
1.4.2 ŽRELO.....	8
1.4.3 POŽIRALNIK.....	9
1.4.4 ŽELODEC.....	9
1.4.5 TANKO ČREVO.....	10
1.4.6 DEBELO ČREVO.....	12
1.5 BLATO.....	16
1.6 PRIKRITA KRI V BLATU.....	16
1.7 KRVAVITVE IZ PREBAVIL.....	16
1.7.1 HEMATEMEZA.....	16
1.7.2 MELENA.....	17
1.7.3 HEMOHEZIJA ALI HEMATOHEZIJA.....	17
1.7.4 AKUTNE KRVAVITVE.....	17
1.7.5 KRONIČNE KRVAVITVE.....	18

1.8 DIAGNOSTIKA PRIKRITE KRVI V BLATU.....	18
1.8.1 KLINIČNA DIAGNOSTIKA.....	18
1.8.1.1 ANAMNEZA.....	18
1.8.1.2 ENDOSKOPIJA.....	18
1.8.1.3 ULTRAZVOK.....	19
1.8.1.4 ENDOLUMINALNI ENDOSKOPSKI ULTRAZVOK.....	19
1.8.1.5 POZITRONSKA EMISIJSKA TOMOGRAFIJA (PET).....	20
1.8.1.6 SCINTIGRAFIJA.....	20
1.8.1.7 RAČUNALNIŠKA TOMOGRAFIJA (CT).....	21
1.8.1.8 MAGNETNA RESONANCA (MR).....	21
1.8.2 LABORATORIJSKE PREISKAVE KRVI.....	21
1.8.2.1 TUMORSKI OZNAČEVALCI.....	22
1.8.3 METODE ZA DOLOČANJE PRIKRITE KRVI V BLATU.....	23
1.8.3.1 PRESEJALNI NESPECIFIČNI TEST (TEST NA PRIKRITO KRI NA PODLAGI GVAJAK SMOLE).....	23
1.8.3.2 IMUNOLOŠKI KVALITATIVNI TEST.....	24
1.8.3.3 IMUNOLOŠKI KVANTITATIVNI TEST.....	24
2. NAMEN DELA.....	26
3. EKSPERIMENTALNI DEL.....	27
3.1 PREISKOVANCI.....	27
3.2 VZORCI.....	27
3.3 ANALIZA VZORCEV.....	27
3.3.1 KVANTITATIVNA METODA ZA DOLOČANJE PRIKRITE KRVI V BLATU IMMO CARE – C.....	27
3.3.1.1 PRINCIP TESTA.....	27
3.3.1.2 POSTOPEK IZVEDBE TESTA.....	28
3.3.1.3 INTERPRETACIJA TESTA.....	29

3.3.1.4 OBČUTLJIVOST TESTA.....	30
3.3.1.5 INTERFERENCE.....	30
3.3.2 KVANTITATIVNA METODA ZA DOLOČANJE PRIKRITE KRVI V BLATU FOB GOLD.....	30
3.3.2.1 PRINCIP METODE.....	30
3.3.2.2 ZBIRALNA EPRUVETA.....	31
3.3.2.3 PRIPRAVA VZORCA BLATA.....	32
3.3.2.4 ANALIZATOR SENTIFOB.....	32
3.3.2.5 DELOVNI POSTOPEK.....	33
3.3.2.6 INTERPRETACIJA REZULTATOV.....	37
3.3.2.7 MEJNA VREDNOST (CUT OFF).....	37
3.3.2.8 VZDRŽEVANJE SISTEMA.....	37
3.4 STATISTIČNE METODE.....	38
4. REZULTATI.....	39
4.1 OPIS PREISKOVANCEV.....	39
4.2 STATISTIČNA PRIMERJAVA IMMO CARE – C IN FOB GOLD METODE.....	44
4.3 STATISTIČNA PRIMERJAVA IMMO CARE – C, FOB GOLD METODE IN SPOLA PREISKOVANCEV.....	46
4.4 STATISTIČNA PRIMERJAVA IMMO CARE – C, FOB GOLD METODE IN STAROSTI PREISKOVANCEV.....	47
5. RAZPRAVA.....	49
6. SKLEP.....	52
7. LITERATURA.....	54

POVZETEK

Prikrita kri v blatu je velikokrat znak obolenja prebavil. Bolezni na začetku nimajo značilnih simptomov in jih je včasih težko odkriti pravočasno. Prikrita kri se s prostim očesom ne opazi zato je potrebno opraviti analizo vzorca blata. Bolezni prebavil so pogostejše pri populaciji starejših od 50 let, zato je po 50. letu priporočljivo, da se opravijo preventivni pregledi, kot jih ponuja program Svit (Državni program presejanja in zgodnjega odkrivanja raka na debelem črevesu in danki). Program pozove starejše od 50 let, da opravijo preventivni pregled blata, da se morebiti prisotna bolezen odkrije čimprej, ko je še v zgodnjem stadiju in je lažje ozdravljiva. Poleg dokazovanja prikrite krvi v blatu se zdravniki za potrditev diagnoze poslužujejo tudi drugih preiskav, kot so endoskopske preiskave, histološka preiskava, magnetna resonanca in druge.

V naši raziskavi smo primerjali kvalitativno in kvantitativno metodo za določanje prikrite krvi v blatu. V raziskavo smo vključili 132 preiskovancev. Vzorce smo analizirali s kvantitativno metodo FOB Gold in kvalitativno metodo ImmoCARE – C. Ugotovili smo, da je za dokazovanje prikrite krvi v blatu bolj primerna kvantitativna metoda FOB Gold. FOB Gold metoda je bolj občutljiva od kvalitativne metode ImmoCARE – C in sicer je občutljivost ImmoCARE – C metode je 30,0 µg Hb / g blata, občutljivost FOB Gold metode pa 8,5 µg Hb / g blata = 50 ng Hb / mL pufra. Prednost kvantitativne metode je poleg kvantitativnih rezultatov tudi nastavljiva mejna vrednost, ki jo usposobljeni delavci v laboratoriju nastavijo na določeno vrednost, v skladu z analitično in klinično validacijo testa. Kvalitativni test je imunološki kromatografski test, kjer se mejna vrednost ne da nastavljati, in se rezultat poda kot negativno ali pozitivno. Obe metodi sta enostavni in prijazni do analitika. Kvalitativni test je hitrejši, rezultate odčitamo po 5 minutah, kvantitativna metoda je dolgotrajnejša, saj moramo pred analizo vzorec prenesti v pufer in počakati eno uro, da se hemoglobin iz vzorca ekstrahira, preden opravimo analizo.

Pri analizi smo ugotovili, da se rezultati ujemajo v 91,6 %. Pozitivni rezultati obeh metod se ujemajo v 73,3 %, negativni pa v 97,1 %. Na podlagi teh izračunov smo ugotovili, da se negativni rezultati dobro ujemajo med seboj, medtem ko se pozitivni rezultati ujemajo slabše. Vzroki za slabše ujemanje pozitivnih rezultatov so posledica slabše občutljivosti kvalitativne metode, ali nehomogenosti Hb v vzorcu. Vzrok je lahko tudi posledica jemanja zdravil, ki vsebujejo acetilsalicilno kislino, nesteroidnih protivnetnih zdravil, glukokortikoidov ali derivatov kumarina. Rezultat je lahko lažno pozitiven tudi v primeru, če ima pacientka menstruacijo, zato je potrebno opozoriti pacientke, da se vzorec odvzame 3 dni po končani menstruaciji. Vzrok dobrega ujemanja negativnih rezultatov je v tem, da sta obe metodi visoko specifični za človeški hemoglobin, metodi ne reagirata z živalskim hemoglobinom, ki ga dobimo v organizmu z mesom, zato ni potrebna dieta med analizo, kar je tudi velika prednost obeh testov.

Po izračunanih statističnih parametrih kot sta kontingencijski koeficient in koeficient korelacije ranga po Spearmanu je razvidno, da metodi nista najbolje povezani, vzrok je najverjetneje različna občutljivost obeh testov, saj je kvantitativna metoda bistveno bolj

občutljiva kot kvalitativna. Statistični parametri so nam tudi razkrili, da spol preiskovancev ne vpliva na pozitiven rezultat, saj je kontingencijski koeficient nizek. Statistični parametri kažejo, da tudi starost preiskovancev ni povezana s pozitivnim rezultatom, saj je koeficient korelacije ranga po Spearmanu nizek.

ABSTRACT

Occult blood in feces is often the sign of gastrointestinal disease. Disease initially don't have typical symptoms and is sometimes difficult to detect in time. Occult blood is invisible to human eye, that is why we have to perform analysis of feces. Gastrointestinal disorders are more common in the population older than 50 years, therefore it is advisable to carry out preventive examinations offered by the program Svit (National program for screening and early detection of cancer of the colon and rectum). The program provides screening of feces to detect presence of occult blood. The disease and diagnosis is easily treatable in early stage. In addition to proving occult blood in feces, the doctors are also conducting other tests too. Those examinations are endoscopic examination, histological examination, magnetic resonance and others.

In our research we compared qualitative and quantitative methods for the detection of occult blood in faeces. The research included 132 subjects. Samples were analysed with quantitative method FOB Gold and qualitative method ImmoCARE – C. For demonstration of the hidden blood in feces is more suitable quantitative method FOB Gold. FOB Gold method is more sensitive than the qualitative method ImmoCARE – C, sensitivity of ImmoCARE – C method is 30 µg Hb / g feces, the sensitivity of FOB Gold method is 8,5 µg Hb / g feces = 50 ng Hb / mL buffer. The advantage of quantitative methods is addition to quantitative results of the adjustable threshold value that skilled workers in the laboratory are set to some value, purchased by the analytical and clinical validation of the test. Qualitative test is an immunological chromatographic test, where the threshold can not be adjusted, and the result is given as the coloration of the test field. Both methods are simple and friendly to the analyst. Qualitative test is faster and the results are read after 5 minutes, the quantitative method is prolonged, because we need to immerse sample with buffer and wait one hour to extract the hemoglobin from the sample before analysis is carried out.

Deducted from the analysis we found that the results match in 91,6 % of cases. Positive results from both methods match in 73,3 %, negative in 97,1 % of cases. Based on these calculations we can conclude that the negative results agree well with each other, while the positive results appear worse. The reasons for the positive results have worse match is due to worse sensitivity of qualitative method, or Hb in the sample is inhomogeneity. The cause can also result from taking drugs which contains acetylsalicylic acid, non steroid anti-inflammatory drugs, corticosteroids or coumarin derivatives. The result may be a false positive even if the patient is menstruating, therefore the patient should be noted that the sample must be taken 3 days after menstruation. Cause good negative correlation is that both methods are highly specific for human hemoglobin, the methods do not react with animal hemoglobin that result in the organism with eating meat, that is why diet before analysis is not necessary, which is also the great advantage of both tests.

According to the calculated statistical parameters such as contingency coefficient and Spearman correlation shows that the methods are medium associated, most likely caused

by different sensitivity of both tests, as the quantitative method is much more sensitive than the qualitative method. Statistical parameters also revealed that sex of subjects does not affect the positive result, as contingency coefficient is low. Statistical parameters indicate that the age of the subjects is not associated with a positive result, as Spearman correlation is low.

SEZNAM OKRAJŠAV

2,3 – DPG: 2,3 – DIFOSFOGLICERAT

ATP: ADENOZIN TRI FOSFAT

CA: KARCINOMSKI ANTIGEN

CEA: KARCINOENBRIONALNI ANTIGEN

CT: RAČUNALNIŠKA TOMOGRAFIJA

ER: ENDOPLAZMATSKI RETIKULUM

Fe: ŽELEZO

FOBT: TEST NA PRIKRITO KRI V BLATU

GIST: GASTROINTESTINALNI STROMALNI TUMORJI

Hb: HEMOGLOBIN

HbF: FETALNI HEMOGLOBIN

MR: MAGNETNA REZONANCA

NADH: NIKOTINAMID ADENIN DINUKLEOTID

PET: POZITRONSKA EMISIJSKA TOMOGRAFIJA

RNDČ: RAK NA DEBELEM ČREVESU

SD: STANDARDNI ODKLON

TIBC: CELOTNA KAPACITETA VEZANJA ŽELEZA

TO: TUMORSKI OZNAČEVALCI

SEZNAM SLIK

SLIKA 1: STRUKTURA HEMOGLOBINA

SLIKA 2: DISOCIACIJSKA KRIVULJA ZA OKSIHEMOGLOBIN

SLIKA 3: JETRA, OBARVANE MODRE GRANULE SO HEMOSIDERIN

SLIKA 4: PREBAVILA

SLIKA 5: KOLONOSKOPIJA

SLIKA 6: POZITRONSKA EMISIJSKA TOMOGRAFIJA

SLIKA 7: IMMO CARE - C

SLIKA 8: INTERPRETACIJA REZULATATOV TESTA IMMO CARE - C

SLIKA 9: PRINCIP REAKCIJE

SLIKA 10: ZBIRALNA EPRUVETA

SLIKA 11: PRIPRAVA VZORCA V LABORATORIJU

SLIKA 12: ANALIZATOR SENTIFOB

SLIKA 13: PRIMER KALIBRACIJSKE KRIVULJE

SLIKA 14: PRIMER GRAFIČNEGA PRIKAZA REZULTATOV KONTROLNIH VZORCEV

SLIKA 15: POTEK REAKCIJE

SLIKA 16: GRAFIČNI PRIKAZ ŠTEVILA PREISKOVANCEV UDELEŽENIH V RAZISKAVI GLEDE NA SPOL IN STANDARDNA DEVIACIJA

SLIKA 17: GRAFIČNI PRIKAZ POVPREČNE STARSOTI PREISKOVANCEV IN STANDARDNA DEVIACIJA

SLIKA 18: GRAFIČNI PRIKAZ POVPREČNE STAROSTI PREISKOVANCEV PRI POZITIVNEM REZULTATU IMMO CARE – C IN FOB GOLD METODE IN STANDARDNA DEVIACIJA

SLIKA 19: GRAFIČNI PRIKAZ ŠTEVILA POZITIVNIH IN NEGATIVNIH REZULTATOV PRI METODI FOB GOLD IN IMMO CARE-C

SEZNAM PREGLEDNIC

PREGLEDNICA I: RAZPOREDITEV ŽELEZA (Fe) V TELESU PRI 70 kg TEŽKEM MOŠKEM

PREGLEDNICA II: POVEZAVE MED VELIKOSTJO ADENOMOV, HISTOLOŠKIM TIPOM IN STOPNJO DISPLAZIJE

PREGLEDNICA III: PRIMERJAVA MED OC SENZOR ANALIZATORJEM IN SENTIFOB ANALIZATORJEM

PREGLEDNICA IV: PRIPRAVA KALIBRACIJSKE KRIVULJE

PREGLEDNICA V: REZULTATI PREISKAVE Z IMMO CARE – C IN FOB GOLD METODO

PREGLEDNICA VI: STATISTIČNI PARAMETRI PRIMERJAVE OBEH METOD

PREGLEDNICA VII: SKUPINE PREISKOVANCEV GLEDE NA REZULTATE

PREGLEDNICA VIII: REZULTATI IZRAČUNA % UJEMANJA REZULTATOV

PREGLEDNICA IX: SKUPINE PREISKOVANCEV GLEDE NA SPOL IN REZULTAT PRI IMMO CARE – C METODI

PREGLEDNICA X: DELEŽ PREISKOVANCEV GLEDE NA SPOL PRI IMMO CARE – C METODI

PREGLEDNICA IX: SKUPINE PREISKOVANCEV GLEDE NA SPOL PRI FOB GOLD METODI

PREGLEDNICA XII: DELEŽ PREISKOVANCEV GLEDE NASPOL PRI FOB GOLD METODI

PREGLEDNICA XIII: STATISTIČNI PARAMETRI ZA OBE METODI GLEDE NA SPOL

PREGLEDNICA XIV: SKUPINE PREISKOVANCEV GLEDE NA STAROST IN DELEŽ PREISKOVANCEV

PREGLEDNICA XV: STATISTIČNI PARAMETRI ZA OBE METODI GLEDE NA STAROST

SEZNAM ENAČB

ENAČBA 1: ENAČBA ZASIČENJA TRANSFRINA Z ŽELEZOM

ENAČBA 2: ENAČBA % UJEMANJA REZULTATOV

ENAČBA 3: ENAČBA % UJEMANJA POZITIVNIH REZULTATOV

ENAČBA 4: ENAČBA % UJEMANJA NEGATIVNIH REZULTATOV

1. UVOD

1.1. KRI

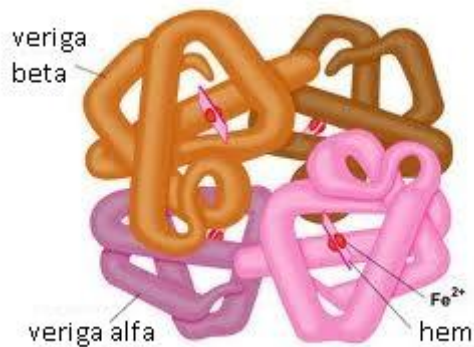
Kri je tekoče tkivo, v katerem so krvne celice v medceličnini, imenovani plazma. Krvne celice predstavljajo približno 45 %, krvna plazma pa 55 % celotne krvi (1). Vse krvne celice nastajajo pri človeku v krvotvornem ali hematopoetskem tkivu. Pri odraslem človeku sta to rdeči kostni mozeg in limfatično tkivo. Vse krvne celice nastanejo iz matičnih celic v kostnem mozgu. Glavna lastnost matičnih celic je sposobnost samoobnove in s tem ohranitve svojih lastnosti in sposobnost dozorevnja v matične celice, ki so usmerjene v določeno vrsto krvnih celic. Nastajanje krvnih celic je natančno uravnano in omogoča stalno in enakomerno nadomeščanje propadlih krvnih celic. Dnevno ustvarja odrasel človek 2,5 milijardi eritrocitov, 2,5 milijarde trombocitov in 1 milijardo granulocitov na kilogram telesne mase. Kadar je potrebno, se ustvarjenje lahko poveča (2).

1.2 ZGRADBA IN DELOVANJE ERITROCITOV

Eritrociti so zrele celice rdeče vrste. Njihova naloga je prenos kisika iz pljuč v periferna tkiva. Ker vsebujejo encim karboanhidrazo, ki katalizira nastajanje in razpad ogljikove kisline, posredno sodelujejo tudi pri transportu ogljikovega dioksida iz tkiv. So 7 do 8 μm velike celice, ki imajo obliko bikonkavne ploščice. Zlahka spremenijo obliko, kar jim omogoča neoviran prehod skozi kapilare. Njihova glavna sestavina je hemoglobin, ki ga je 98 % vseh beljakovin v citoplazmi. Zaradi njega se pri panoptičnem barvanju obarvajo rožnato oranžno (2).

Molekulska masa hemoglobina je okoli 64 kDa. Hemoglobin je tetramer iz dveh parov polipeptidnih verig globina (Slika 1). Vrsto verige označujemo z grškimi črkami alfa, beta, gama, delta, zeta, epsilon. Molekula hemoglobina je sestavljena iz dveh verig alfa in dveh verig ne – alfa (beta, gama, delta, zeta, epsilon). Verigi epsilon in zeta sta prisotni samo v embrionalnih hemoglobinih. Glede na vrsto ne – alfa globinskih verig poznamo pri odraslem tri vrste normalnih hemoglobinov, ki jih označujemo z veliki črkami latinske abecede: A, A₂, F. Glavna vrsta je HbA (96 – 98 %). Sestavljen je iz dveh verig alfa in dveh verig beta (alfa₂, beta₂). Poleg HbA je v eritrocitih odraslega 1,5 – 3 % HbA₂ (alfa₂, delta₂). Fetalni hemoglobin (HbF, alfa₂, gama₂), ki je glavna vrsta hemoglobina v poznem fetalnem obdobju in ob rojstvu, je pri odraslem le v sledovih (0,5 – 1 %). Vsaka veriga

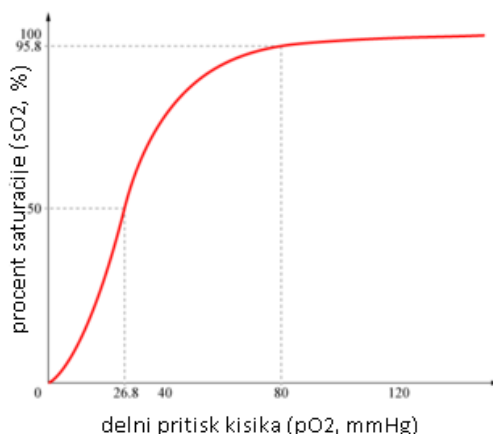
globina ima v terciarni zgradbi hidrofobni žep, kjer je vezana prostetična skupina – hem (2).



Slika 1: Struktura hemoglobina

Hem sestoji iz protoporfirina, v katerem je vezan atom dvovalentnega železa. V kvartarni zgradbi hemoglobina razlikujemo dve vrsti stičnih predelov med globinskimi verigami:

- V prvem stičnem področju povežejo elektrostatične sile verigi alfa in beta v alfa – beta dimer, kar omogoča stabilnost tetramera.
- V drugem stičnem področju pride v času vezave oziroma odpuščanja kisika, do rotacije enega dimera nasproti drugemu. To ima za posledico spremembo afinitete za kisik (hem – hem interakcija). Zaradi opisane spremembe afinitete za kisik ima disociacijska krivulja za oksihemoglobin sigmoidno obliko (Slika 2).



Slika 2: Disociacijska krivulja za oksihemoglobin

Sintezo posameznih globinskih verig uravnavaajo ustrezni strukturni geni. Dedovanje globina poteka po Mendelovih zakonih (2).

Za razliko od drugih krvnih celic eritrociti nimajo jedra, endoplazmatskega retikuluma (ER) z ribosomi in mitohondrijev. Zato niso zmožni delitve, sinteze beljakovin in ne porabljajo kisika. Vse energijske potrebe si zreli eritrocit zagotovi z razgradnjo glukoze. Okoli 90 % glukoze se razgradi do laktata v anaerobni glikolizni poti (Embden – Meyerhofova pot), približno 10 % pa v oksidativnem heksozamonofosfatnem kratkem spoju (šant) (2).

Pri glikolizi nastanejo naslednji pomembni presnovki:

- Adenozin tri fosfat (ATP), ki vsebuje veliko uskladiščene energije. Ta spojina je nujno potrebna za delovanje ionske črpalke, ki vzdržuje stalno ionsko sestavo citoplazme.
- 2,3 – difosfo glicerat (2,3 – DPG) je eden najvažnejših regulatorjev afinitete hemoglobina za kisik. Ko se 2,3 – DPG reverzibilno veže na globinsko verigo beta, zmanjša afiniteto hemoglobina za kisik in s tem povzroči pomik disociacijske krivulje v desno.
- Nikotin amid adenin dinukleotid (NADH) je pomemben za delovanje encima methemoglobin-reduktaze, ki reducira methemoglobin v hemoglobin in s tem vzdržuje železo v hemoglobinu v dvovalentni obliki (2).

1.2.1 RAZGRADNJA ERITROCITOV

Normalna življenjska doba eritrocitov je 100 do 120 dni. Ko ostarijo, jih fagocitirajo makrofagi retikuloendoteljnega sistema. Glavno vlogo pri razgradnji ostarelih eritrocitov ima vranica. S staranjem eritrocitov se zmanjša aktivnost številnih encimov, ki so vzdržujejo njihovo zgradbo in funkcije. Zato se zmanjša upogljivost eritrocitne membrane in poveča krhkost eritrocitov, zmanjša se površinski naboj membrane in poveča količina methemoglobina v eritrocitu. Te in druge spremembe, ki nastanejo s staranjem eritrocitov, upočasnijo njihov prehod skozi rdečo vranično pulpo. Za eritrocite neugodno okolje v rdeči pulpi (nizka koncentracija glukoze, blaga hipoksija s hiperkapnijo in nekoliko nižji pH) dodatno okvari ostarele eritrocite, ki jih nato makrofagi fagocitirajo. Sproščeni hemoglobin se v makrofagih razgradi v globin in hem. Aminokisliline, ki se pri proteolizi hemoglobina sprostijo, se porabijo za sintezo drugih beljakovin. Protiporfirinski obroč se najprej odpre in nato reducira v bilirubin. Pri cepitvi protiporfirinskega obroča se sprostijo železo, ki se uskladišči v feritinu. Bilirubin iz makrofagov prehaja v kri, kjer se

veže na serumski albumin (nekonjugirani ali indirektni bilirubin). V jetrih prehaja z glukoronsko kislino in postane vodotopen (konjugirani ali direktni bilirubin). Slednjega jetrne celice izločijo v žolč. V debelem črevesju ga bakterije reducirajo v urobilinogen. Večji del urobilinogena se izloči z blatom, del pa se ga resorbira in znova izloči v žolč. Nekoliko se ga izloči s sečem, kjer se lahko oksidira v urobilin (2).

1.3 ŽELEZO

Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije je v svetovnem merilu pomanjkanje železa prisotno pri 30 % ljudi, pri 43 % predšolskih otrok, pri 37 % šolskih otrok, pri 51 % nosečnic (2).

1.3.1 PRESNOVA ŽELEZA

Železo je sestavina celic in sodeluje v številnih kemičnih reakcijah. V tkivih se železo ne nahaja kot prosto - kation, temveč je vedno vezano ali vgrajeno v različne beljakovine. Beljakovine s hemom, v katerem se nahaja, so hemoglobin, mioglobin, citokromi, citokrom oksidaza, peroksidaza, katalaza in druge. Večina železa je predvsem v mioglobinu. Vskladiščeno je tudi v feritinu in hemosiderinu makrofagov kostnega mozga, vranice in jeter (Preglednica I) (2).

Preglednica I: Razporeditev železa (Fe) v telesu pri 70 kg težkem moškem

Nahajališče	Fe (mg)	Fe v telesu (%)
Hemoglobin	2000	67
Feritin in hemosiderin	1000	27
Mioglobin	130	3,5
Labilni pool	80	2,2
Tkivno železo	8	0,2
Transportno železo	3	0,08

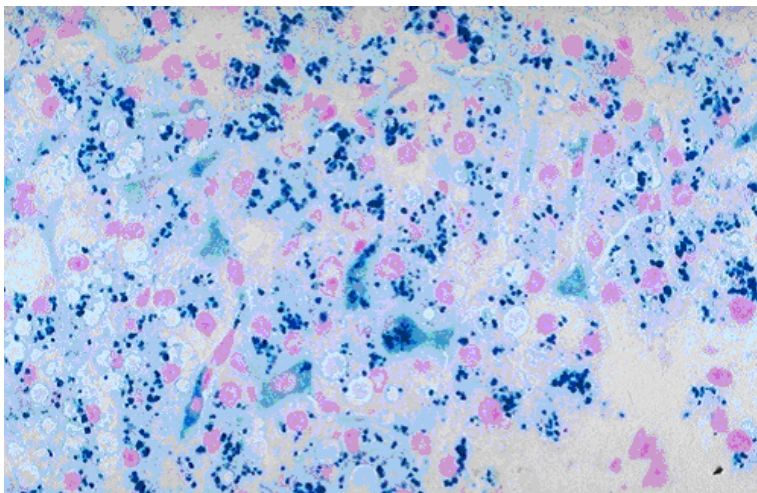
Zaloga železa je pri večini žensk v rodni dobi manjša kakor pri moških iste starosti ali kakor pri ženskah po rodnem obdobju. Vzrok je izguba železa z menstrualno krvjo (2).

1.3.2 IZGUBE ŽELEZA

V fizioloških razmerah izgublamo vedno približno enako količino železa dnevno. Razlike so le glede na spol in starost. Moški ali ženske po rodni dobi izgubijo dnevno 1 mg železa z odluščenimi celicami prebavil, kože, s sečem in znojem. Ženska izgubi z menstruacijo 30 do 40 mL krvi, kar je 15 do 20 mg železa. To pomeni dodatnih 0,5 mg železa dnevno. Z nosečnostjo in porodom izgubi 500 mg železa (2).

1.3.3 ABSORPCIJA ŽELEZA

Povprečna dnevna količina železa v hrani je 10 do 20 mg. Potrebo po železu uravnavamo z absorpcijo železa iz hrane. V hrani je železo bodisi v obliki hema (mioglobin in hemoglobin) ali anorganskih soli (ionsko železo). Železo v obliki hema se bolje absorbira kot ionsko železo. Pri zdravem se iz hrane absorbira do 10 % vsega železa, pretežno v dvanajsterniku in jejunumu. Lažje se absorbira dvovalentno (fero) železo kot trivalentno (feri). Absorpcijo železa zavirajo tanati, karbonati, oksalati, fosfati, nekateri antacidi, kot je magnezijev trisilikat, medtem ko jo nekatere druge snovi v prehrani pospešujejo, npr. askorbinska, citronska kislina, sladkorji in aminokisliline. Absorpcija je slabša, če želodčni sok ni zadosti kisel. Količina železa, ki se absorbira iz hrane, je odvisna tudi od količine uskladiščenega železa in obsega eritropoeze. Pri pomanjkanju se absorpcija železa iz hrane poveča na 15 do 20 %. Absorpcija anorganskega železa v mukoznih celicah je aktivni proces. Pri pomanjkanju železa naj bi se absorpcija povečala, medtem ko naj bi se pri prebitku zmanjšala. Osrednjo vlogo v uravnavanju metabolizma železa ima hepcidin. To je peptid, ki ga izločajo hepatociti in zavira tako absorpcijo železa iz prebavil kot njegovo sproščanje iz makrofagov (Slika 3). Izločanje hepcidina se poveča pri vnetju in pri povečanih zalogah železa v telesu. Povečana eritropoeza zavre izločanje hepcidina (2).



Slika 3: Jetra, obarvane modre granule so hemosiderin

1.3.4 KONCENTRACIJA FERITINA V SERUMU IN ZASIČENJE TRANSFERINA Z ŽELEZOM

S koncentracijo feritina ocenimo zaloge železa v telesu, z zasičenostjo transferina pa razpoložljivost železa za eritropoezo. Če so zaloge železa zmanjšane ali izpraznjene, je koncentracija feritina v serumu pod 10 µg/L. Koncentracijo transferina navadno merimo posredno z merjenjem celotne vezalne sposobnosti za železo (TIBC). Zasičenje transferina z železom izračunamo iz koncentracije serumskega železa in TIBC:

$$\frac{Fe \times 100}{TIBC}$$

Enačba 1: Enačba za izračun zasičenja transferina z železom

Razpoložljivost železa za eritropoezo je zmanjšana, če je zasičenje transferina manjše od 15 %. V določenih bolezenskih stanjih je ugotavljanje pomanjkanja železa s feritinom in zasičenjem transferina nezanesljivo. Tak primer so bolniki z odpovedjo ledvic v programu kronične dialize, ki jih zdravimo z eritropoetinom. Pri njih ocenimo razpoložljivost železa za eritropoezo iz deleža hipokromnih eritrocitov v krvi ali z določitvijo količine hemoglobina v retikulocitih. Tudi pri vnetjih je ocena zalog železa nezanesljiva, ker vnetje neodvisno od zalog železa poveča koncentracijo feritina v krvi. Tu si lahko do neke mere pomagamo tako, da pomaknemo mejno vrednost koncentracije feritina navzgor. Bolje je določiti koncentracijo transferinskih receptorjev v serumu, saj nanje vnetje ne vpliva. Pri pomanjkanju železa se koncentracija teh receptorjev v serumu poveča. V epidemioloških

raziskavah se kot presejalna preiskava uporablja določanje prostega protiporfirina v eritrocitih. Protiporfirini se določajo neposredno iz kaplje krvi s prenosno napravo (hematofluorimeter). Koncentracija prostega protiporfirina v eritrocitih se pri pomanjkanju železa poveča (2).

1.3.5 ANEMIJA ZARADI POMANJKANJA ŽELEZA

Anemija zaradi pomanjkanja železa (*sideropenična deficitirna*) je najpogostejša anemija. Pojavlja se pri ljudeh vseh starosti, različnega socialnega in ekonomskega položaja. Pogostejša je pri mladih do pubertete in pri ženskah v rodni dobi. Anemijo zaradi pomanjkanja železa najdemo pri 20 % žensk v rodni dobi, pri odraslih moških pa le pri 2 % (2).

Pomanjkanje železa in anemija zaradi pomanjkanja železa nastaneta postopno. Najprej se porabi uskladiščeno železo. V makrofagih kostnega mozga ne najdemo feritina in hemosiderina, koncentracija železa v serumu je še normalna, ni anemije, zmanjšana je koncentracija serumskega feritina ($< 10 \mu\text{g} / \text{L}$). V naslednjem obdobju se zmanjšata koncentracija železa v serumu in zasičenost transferina z železom. Šele zatem nastane tudi anemija (2).

Pri odraslih je kronična krvavitev najpogostejši vzrok za pomanjkanje železa. Pri ženskah v rodni dobi sta pogosta vzroka krvavitve menoragija in metroragija, ki nastaneta zaradi funkcionalnih motenj, benignih in malignih tumorjev maternice. Pri moškem in ženski po rodni dobi je anemija najpogosteje posledica očitne ali prikrite krvavitve v prebavila, zato je potrebno večkrat pregledati blato na prikrito krvavitev (2).

1.4 PREBAVILA

Prebavila sestavljajo organi, ki tvorijo prebavno cev in prebavne žleze. Deli prebavne cevi so:

- Ustna votlina
- Žrelo
- Požiralnik
- Želodec
- Tanko črevo

- Debelo črevo (Slika 4)

K prebavnim žlezam prištevamo velike žleze slinavke, jetra in trebušno slinavko (1).

Prebavna cev sprejema in predeluje hrano v sestavine, ki so topne ali emulgirane v vodi in se lahko vsrkajo v kri in mezgo. Prebavne žleze so izven prebavne cevi, njihova izvodila vodijo v prebavno cev. Izločajo sokove, ki pomagajo v procesu razgradnje hrane (1).

Prebavna cev ima več plasti. Notranja plast, ki meji na svetlino cevi, je sluznica – *tunica mucosa*. Pod njo je podsluznica – *tela submucosa*, ki je iz rahlega veziva in pripenja sluznico na srednjo plast, ki je mišična – *tunica muscularis*. Zunanja plast je vezivna – *tunica adventitia* ali *tunica serosa*. Sluznica je sestavljena iz treh plasti. Od znotraj navzven ločimo: epitelij, njegova oblika je odvisna od funkcije. *Lamina propria mucosae* je tanka plast veziva z žilami in živci. *Lamina muscularis mucosae* je plast gladkih mišičnih vlaken, ki omogočajo premikanje sluznice (3).



Slika 4: Prebavila

1.4.1 USTNA VOTLINA

Ustna votlina je začetni del prebavil. Služi vnosu hrane, okušanju in drugim senzoričnim odzivom na hrano, žvečenju, kemični prebavi hrane, požiranju, govoru in dihanju. Ustna votlina ni zgrajena kot preostali del prebavne cevi, ampak ima koščeno ogrodje, ki ga tvori okostje obrazne lobanje. Zgoraj jo omejujeta zgornji čeljustnici, ki skupaj z nebico tvorita nebo, spodaj in ob straneh pa spodnja čeljustnica. Na koščeno ogrodje so naraščene mišice,

ki tvorijo steno ustne votline. Spredaj omejujeta votlino zgornja in spodnja ustnica, s stani lica. Dno ustne votline je iz skeletnega mišičja. V ustnem dnu je jezik (2).

1.4.2 ŽRELO

Pri odraslem je žrelo dolgo približno 12 cm in sega od sapišč (prehod med nosno votlino in nosnim delom žrela) do vhoda v požiralnik. Zgoraj je priraščeno na lobanjsko bazo in poteka navzdol pred hrbtenico. V žrelo se od spredaj nadaljujeta nosna in ustna votlina. Žrelo je skupni del dihalnega in prebavnega sistema, ker se v njem križata pot za hrano in zrak (2).

1.4.3 POŽIRALNIK

Požiralnik povezuje žrelo z želodcem. Pri odraslem je dolg 25 do 30 cm. Poteka za sapnikom in pred hrbtenico iz vratu v prsni koš. Kjer leži v zadajšnjem medpljučju, nato pa skozi trebušno prepono prestopi v trebušno votlino. Pred njim sta sapnik in srce. Požiralnik je iz gladkega mišičja, razen v zgornjem delu, ki je iz skeletnega mišičja. Znotraj ga odeva sluznica. Prazen požiralnik je skrčen, pri prehodu hrane se razširi do 3 cm. Sluznica je pri praznem požiralniku nabrana v vzdolžne gube (2).

OBOLENJA POŽIRALNIKA

- Varice požiralnika

Varice požiralnika so lahko izvor akutne in obilne krvavitve, ki običajno poteka s hematemezo in meleno. Neredko je portalna hipertenzivna gastropatija (kronična venska kongestija sluznice) vzrok krvavitve iz prebavil pri bolniku z jetrno cirozo in portalno hipertenzijo (2).

- Mallory – Weissov sindrom

Mallory – Weissov sindrom je ime za vzdolžno razpoko sluznice na prehodu požiralnika v želodec. Običajno je posledica dolgotrajnega močnega ali sunkovitega bruhanja. Vodilni klinični znak je hematemeza, največkrat brez melene, ker bolniki vso kri izbruhajo (2).

- Tumorji

Benigni ali maligni tumorji na požiralniku pogosto krvavijo v poznejši fazi bolezni. Krvavitev je kronična ali ponavljajoča in je običajno majhna ali zmerna. Redki bolniki izkrvavijo. Klinično se krvavitev običajno pokaže z meleno in / ali anemijo. Laboratorijsko ugotovimo prisotnost krvi v blatu (2).

- Ezofagitis in peptični ulkus požiralnika
- Poškodbe požiralnika

1.4.4 ŽELODEC

Želodec je najširši del prebavne cevi. Leži v zgornjem delu trebušne votline tik pod trebušno prepono. Na desni ga prekrivajo jetra, na levi je ob njem vranica, za njim so trebušna slinavka, leva ledvica in nadledvična žleza, pod njim je debelo črevo. Zgoraj se dotika trebušne prepone in je pokrit z rebrnim lokom. Večji del želodca leži na levi strani. Lega želodca je odvisna od tonusa trebušnih mišic in lege okolnih organov (2).

Njegova oblika je odvisna od polnitve in tonusa mišičja in se zelo spreminja. Pri pokončni drži telesa ima obliko črke J. Prostornina praznega želodca je približno 50 mL, polnega pa od 1000 do 1500 mL. Želodčni svod in večji del telesa sta skrita za levim rebrnim lokom, antrum in piloris sta v epigastričnem kotu (približno sredina razdalje med ksifoidnim odrastkom prsnice in popkom) (2).

OBOLENJA ŽELODCA

- Želodčni ulkus
- Želodčni maligni in benigni tumorji

Krvavitve iz leiomiomov in leiomiosarkomov v želodcu, ki so zelo redki tumorji, so lahko zelo obilne in se najpogosteje pokažejo s hematemezo. Med najpogostejšimi krvavečimi tumorji želodca so limfomi želodca (2).

- Erozivni gastritis

Tako posamezne ali številne erozije želodca so drugi najpogostejši vzrok krvavitve.

- Želodčne varice
- Poškodbe želodca

1.4.5 TANKO ČREVO

Tanko črevo je najdaljši odsek prebavni cevi. Meri 3 – 5 m. Vijuge tankega črevesa zapolnjujejo večji del trebušne votline pod želodcem in jetri ter medenico. Tanko črevo delimo glede na lego in zgradbo v tri odseke:

- Dvanajsternik
- Tešče črevo
- Vito črevo

Dvanajsternik je začetni del tankega črevesa. Dolg je približno 30 cm in širok približno 6 cm. Začne se pri pilorisu z razširjenim delom in se nadaljuje v tešče črevo. Dvanajsternik ima obliko podkve, ki je s konveksiteto obrnjena v desno. S konkavno stranjo objema glavo trebušne slinavke. Dvanajsternik meji desno na jetra in žolčnik, levo obdaja glavo trebušne slinavke, spodaj meji na prečno debelo črevo. Zadaj pa meji na desno ledvico in nadledvično žlezo (2).

Tešče črevo in vito črevo obsegata skoraj dve tretjini dolžine prebavne cevi. V svojem poteku imata 11 – 13 zavojev. Zavoj ima prost konveksni del, na konkavni del pa je vezan oporek. Po njem potekajo v črevesju arterije, vene, mezgovnice in živci. Mezenterij omogoča tudi gibljivost črevesja. Tešče črevo prične v zgornjem levem kvadrantu trebušne votline in leži v predelu okrog popka. Vito črevo tvori 60 % dolžine tankega črevesa brez dvanajsternika. Zapolnjuje središnji spodnji trebušni predel in del medenice. Končni del tankega črevesa je ileocekalni stik, kjer ileum preide v slepo črevo (2).

OBOLENJA TANKEGA ČREVESJA

- Maligni in benigni tumorji

Najpogostejše benigne neoplazme tankega črevesa so adenomi, leomiomi in lipomi, ki so običajno klinično nemi ali jih slučajno najdemo pri endoskopiji ali obdukciji. Težave nastopijo pri delni ali popolni zapori črevesne svetline. Pogosto nastopi intususcepcija. Pogosto se pojavljajo tudi prikrite krvavitve (2).

- Meckelov divertikel

Meckelov diventrikel je najpogostejša klinično pomembna kongenitalna anomalija prebavne cevi in je ostanek omfalomezenteričnega duktusa. Običajno leži na proksimalni meji ileuma (približno 100 cm oralno od ileocekalne valvule). Pomembne so ektopije želodčne korpusne sluznice v Meckelovem diventriklu. Tovrstna sluznica izloča kislino, kar lahko povzroči peptično poškodbo sluznice in razjedo. Neredko iz razjede bolnik zakrvari. Krvavitev iz Meckelovega diventrikla je velik diagnostični problem, ki ga pogosto pojasnimo šele z eksplorativno operacijo (2).

- Enteritisi (bakterijski, tuberkulozni)
- Vnetne bolezni tankega črevesa (Chronova bolezen, ulcerozni kolitis)

Pri Chronovi bolezni proces zajame vse dele prebavne cevi, od sluznice v ustni votlini do anusa. Bolezen je redka v zgornjih prebavilih, daleč najpogoste sta prizadeta terminalni ileum in / ali debelo črevo. Spremembe lahko potekajo kontinuirano, vendar so značilni tudi izmenjujoči se bolni in zdravi predeli. Pri Chronovi bolezni zajame vnetni proces v nasprotju z ulceroznim kolitisom običajno vse sloje črevesne stene (2).

Ulcerozni kolitis je kronična bolezen, najpogosteje poteka v zagonih, remisije so lahko dolge tudi po več let. Klinična slika je odvisna od razširjenosti in intenzivnosti vnetja ter pri posameznih bolnikih zelo različna. Vodilni znaki so številna krvavo sluzasta iztrebljanja, lažni pozivi k iztrebljanju, tenezmi, bolečine v trebuhu, zvišana telesna temperatura, anemija, hujšanje (2).

- Ishemični enteritisi
- Akutna mezenterialna vaskularna okluzija
- Volvulus in intususcepcija tankega črevesa
- Divertikli tankega črevesa

Lahko jih najdemo v kateremkoli delu tankega črevesa. Z izjemo Meckelovega divertikla so najpogostejši v duodenumu in jejunumu (2).

1.4.6 DEBELO ČREVO

Debelo črevo obsega:

- Slepo črevo
- Kolon

- Danko

Dolgo je približno 1,5 m in približno 6,5 cm široko. Po svoji zunanji in notranji obliki se razlikuje od tankega črevesa. Sluznica debelega črevesa ni nagubana, nima resic, niti toliko limfnih foliklov (2).

Začetni del debelega črevesa je slepo črevo, ki je v obliki slepe vreče in 8 – 10 cm dolgo. Leži v spodnji desni četrtini trebušne votline. Od tankega črevesa ga loči ileocekalna zaklopka, ki preprečuje vračanje črevesne vsebine iz debelega črevesa v tanko črevo. Iz slepega črevesa izhaja izrastek – slepič. Njegova dolžina je različna: v povprečju od 7 do 10 cm (2).

Kolon je predel debelega črevesa med slepim črevesom in danko. Razdelimo ga na navzgornji kolon, prečni kolon in esasti kolon. Navzgornji kolon poteka na desni navzgor od ileocekalne zaklopke do jeter. Spredaj ga pokriva peritonej, zadaj pa je priraščen na trebušno steno. Pod žolčnikom se v pravem kotu obrne v levo in preide v prečni kolon, ki je v celoti obdan s peritonejem in poteka pod želodcem v levo do vranice, kjer zavije navzdol kot navzdolnji kolon. Pritrjen je na zadajšnjo trebušno steno. Navzdolnji kolon se nadaljuje v estasto debelo črevo, ki je v obliki črke S. Poteka od črevničnega grebena do drugega križničnega vretenca. Dolg je do 15 do 60 cm. Po vstopu v malo medenico se nadaljuje v danko (2).

Danka je dolga približno 15 cm. Poteka pred križnico. Sega od končnega dela esastega kolona do zadnjika. V poteku se prilagodi krivini križnice s trtico. Danka ima obliko cilindra, ki se v spodnjem delu razširi v ampulo, nato pa spet zoži v analni kanal in nato konča z zadnjikom (2).

OBOLENJA DEBELEGA ČREVESA

- Vnetne bolezni debelega črevesa (Chronova bolezen, ulcerozni kolitis)
- Maligni in benigni tumorji

Krvavitev je navadno majhna, stalna (kronična) ali pa se ponavlja (recidivantna). Blato je lahko črno (melena) ali svetlo rdeče (hemohezija), glede na lokalizacijo rakastega procesa. Kri je pomešana z blatom ali pa so opazne srage krvi na blatu. Krvavitev je lahko očem prikrita in nas nanjo opozorijo nizke vrednosti hemoglobina, železa in majhni eritrociti (2).

Rak debelega črevesa in danke je bil leta 2001 po podatkih Registra raka Slovenije s 14 % drugi najpogostejši rak pri moških, za pljučnim rakom, in z 11 % tretji najpogostejši rak pri ženskah, za rakom na dojki in kožnim rakom. Istega leta so zabeležili 1110 novih primerov tega raka, leto poprej pa 989 novih bolnikov z rakom na debelem črevesu. Incidenca raka na debelem črevesu narašča že od leta 1950, ko se je začela registracija tega raka, od leta 1980 beležimo bolj strm porast predvsem pri moških, tako je bila ocenjena incidenčna stopnja leta 1980; 25 / 100.000 pri obeh spolih, leta 2001 pa kar 64 / 100.000 pri moških in 48 / 100.000 pri ženskah. V svetu in pri nas je rak na debelem črevesu drugi najpogostejši vzrok smrti zaradi rakave bolezni. Podatki iz leta 2001 potrjujejo, da je okrog 86 % bolnikov z rakom debelega črevesa in 74 % bolnikov z rakom danke odkritih, ko se je rak razširil iz črevesne stene v bezgavke (regionalni stadij) ali pa so bili prisotni že zasevki (napredovali stadij). Odstotek relativnega 5 – letnega preživetja pri takšnih bolnikih je bistveno slabši (za obdobje 1993 – 1999: 55 % v regionalnem stadiju razširjenosti in 10 % pri napredovalem stadiju) v primerjavi z relativnim 5 – letnim preživetjem pri tistih bolnikih, kjer je rak debelega črevesa odkrit v lokalno omejeni obliki, ki je 75 % za isto obdobje. Leta 2001 so v lokalno omejeni obliki odkrili samo 11 % raka debelega črevesa in 19,5 % raka danke. Podatki sicer potrjujejo, da se relativno 5 – letno preživetje bolnikov z rakom na debelem črevesu postopoma izboljšuje na račun večjega odstotka zdravljenih bolnikov, izboljšanja operacijske tehnike in pooperativne nege ter zdravljenja, stadij ob diagnozi pa ostaja nepremenjen, prav tako umrljivost, ki v Evropi sodi v sam vrh (4).

Neposrednega vzroka za nastanek kolorektalnega raka ne poznamo. Najpomembnejši dejavniki so: neustrezna prehrana, premajhna telesna aktivnost, adenomatozni polipi črevesne sluznice, kronične vnetne bolezni črevesja, hormonski, genetski dejavniki in obsevanje (2).

Zgodnji simptomi kolorektalnega raka so neznačilni. Še več, 12 % zdravih ljudi brez raka išče zdravniško pomoč zaradi motenj v odvajanju blata, občasnih bolečin v trebuhu in ker so opazili kri na baltu, torej zaradi simptomov, ki so sumljivi za raka. Krvavitev je običajno prikrita, predvsem pri tumorjih v predelu ascendentnega kolona. Zaradi krvavitve se razvije anemija zaradi pomanjkanja železa, ki je pri tovrstnih tumorjih običajno prvi znak, zaradi katerega pride bolnik k zdravniku (2).

Skupine bolnikov z večjim tveganjem za razvoj kolorektalnega raka:

- Bolniki z adenomi (Preglednica II)
- Bolniki s kroničnimi vnetnimi črevesnimi boleznimi
- Bolniki po operacijah raka na debelem črevesu in danki
- Potomci staršev z rakom na debelem črevesu in danki
- Člani družin s hereditarnim neopolipoznim kolorektalnim rakom (2)

Priporočena je dieta z malo maščobami in veliko vlakninami za preprečevanje raka na debelem črevesju (RNDČ). Priporočena je tudi endoskopska preiskava za bolnike z večjim tveganjem, tiste, ki imajo podedovane sindrome in tiste s povišanim družinskim tveganjem. Test na prikrito kri v blatu – faecal occult blood test (FOBT) se uporablja kot presejalni test za odkrivanje RNDČ. Veliko naključnih študij je pokazalo zmanjševanje umrljivosti zaradi RNDČ za 15 – 33 %. Slabost presejanja s FOBT testom je relativno majhna občutljivost kar pomeni veliko nepotrebnih kolonoskopij (5).

Preglednica II: Povezave med velikostjo adenomov, histološkim tipom in stopnjo displazije

	Histološki	Tip			Stopnja	displazije	
Velikost adenoma	Tubularni	Tubulovilozni	Vilozni	Blaga	Zmerna	Huda	
< 1 cm	1	4	10	0,3	2	27	
1 – 2 cm	10	7	10	3	14	24	
> 2 cm	35	46	53	42	50	48	

- Divertikli

Pridobljeni divertikli v debelem črevesu so herniacije mukoze skozi mišični plašč debelega črevesa. Natančen mehanizem nastanka ni znan. 70 % bolnikov z divertikli nima težav in jih odkrijemo naključno. Krvavitev iz divertikla nastopi pri 5 – 15 % bolnikov. Blato in ostanki hrane, ki se naberejo v divertiklu, lahko povzročijo nekrozo sluznice ali mehanično poškodujejo žilje v sluznici mešička in povzročijo krvavitve. (2)

- Zunanji in notranji hemoroidi

Najpogostejše izvorno mesto krvavitve iz spodnjega dela prebavil so hemoroidi. Krvavitev je lahko močna, se rada ponavlja in se pojavi na začetku ali koncu iztrebljanja. Kri je svetlo ali temno rdeča, sveža in največkrat na površini blata.

- Kolitisi (bakterijski, tuberkulozni) (2)

1.5 BLATO

Blato ali feces je pri zdravem, odraslem človeku praviloma mehka, oblikovana, svetlo- do temnorjava masa. Obarvajo ga barvila, ki nastanejo v črevesu iz žolčnih barvil (sterkobilin, sterkobilinogen). Vsaj polovica fecesa je voda, sicer pa vsebuje še neprebavljene ostanke hrane, celulozo, škrob, strupe, soli, žolčne kisline, holesterol, sluz, anorganske snovi, odluščene celice in bakterije. Izpraznjevanje debelega črevesa nadzira center za iztrebljanje v križnih segmentih hrbtnege mozga. Center dobiva pobude iz danke po čutilnih živcih (1).

1.6 PRIKRITA KRI V BLATU

Ugotavljanje prikrite krvi v blatu je danes najpogosteje 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 (6).

Fiziološka izguba krvi z blatom je do 3 mL na dan, to je 2,42 mg Hb / g blata. Vsaka izguba krvi, večja od te vrednosti, je posledica patoloških sprememb v črevesu, vendar ni nujno, da so količine Hb pri bolnikih z rakom vedno nad to vrednostjo (6).

1.7 KRVAVITVE IZ PREBAVIL

Krvavitve iz prebavil so pogost zaplet bolezni prebavil, ki lahko potekajo brez drugih jasnih znakov bolezni. Po načinu nastanka jih ločimo v akutne in kronične; po količini izgubljene krvi v obilne, manjše ali prikrite; po izvoru pa v krvavitve iz zgornjega in spodnjega dela prebavil. Skoraj 85 % vseh krvavitev iz prebavil izvira iz zgornjega dela prebavne cevi (2).

1.7.1 HEMATEMEZA

Hematemeza pomeni bruhanje sveže rdeče, tekoče ali koagulirane ali stare črne krvi in je posledica krvavitve iz predela med ustmi in spodnjim delom dvanajsternika (do višine

Treitzovega ligamenta). Bruhanje črne krvi pomeni, da krvavitev izvira iz zgornje prebavne cevi do konca dvanajsternika. Kri mora biti dovolj dolgo v stiku z želodčno vsebino, da nastane kisli hematin, ki daje črno barvo. Bruhanje rdeče krvi pogosto pomeni, da je izvor krvavitve v požiralniku. Obilna krvavitev iz želodca ali dvanajsternika se lahko pokaže tudi s hematemezo rdeče krvi. V tem primeru zaradi obilice krvi v želodcu kljub stiku z želodčno vsebino še ni prišlo do tvorbe hematina (2).

1.7.2 MELENA

Melena je iztrebljanje mazavega črnega blata in je v večini primerov odraz krvavitve, ki izvira iz lezij od ust do sredine transverzalnega dela debelega črevesa. Značilna črna barva in konsistenca blata je posledica bakterijske razgradnje krvi. Črno barvo dajo sulfuirani razpadni produkti hemoglobina in črno obarvani porfirinski produkti. Melena pomeni, da krvavitev traja že nekaj ur in je pozni znak še potekajoče ali že končane krvavitve.

Običajno jo opazujemo še nekaj dni potem, ko se je krvavitev že ustavila. Z laboratorijskim pregledom lahko prisotnost krvi v blatu dokažemo še takrat, ko je blato že normalnega videza (2).

1.7.3 HEMOHEZIJA ALI HEMATOHEZIJA

Hemohezija pomeni odvajanje sveže rdeče krvi, pomešane z blatom, ali same rdeče krvi in označuje običajno krvavitev od sredine transverzalnega dela debelega črevesa do analne odprtine. Izjemoma je hemohezija lahko znak krvavitve višje v prebavilih. Takrat je krvavitev obilna in je zato pasaža skozi črevo zelo hitra. V teh primerih lahko opazamo istočasno tudi meleno s primesjo večjih ali manjših količin sveže rdeče krvi (2).

1.7.4 AKUTNE KRVAVITVE

Akutne krvavitve so običajno obilnejše, zato bolniki poiščejo pomoč pri zdravniku. Obilna krvavitev zaradi prevelike prostornine kmalu sproži bruhanje ali iztrebljanje blata. Pred, ob ali po bruhanju ali iztrebljanju se lahko pojavijo znaki hipovolemičnega šoka. Klinični simptomi in znaki šoka se lahko pokažejo že pri izgubi 10 % krvi, če je ta nastala v kratkem času (2).

1.7.5 KRONIČNE KRVAVITVE

Pri kroničnih krvavitvah, ki so običajno majhne in počasne, se organizem sproti prilagaja izgubi, zato se klinična slika šoka pojavi le izjemno, čeprav bolniki izgubijo tudi več kot 50 % svoje krvi. Klinično se kronična krvavitev kaže z dlje trajajočo meleno ali mikromeleno in sideropenično deficitarno anemijo (2).

1.8 DIAGNOSTIKA PRIKRITE KRVI V BLATU

1.8.1 KLINIČNA DIAGNOSTIKA:

1.8.1.1 ANAMNEZA

Anamneza in pregled sta pri telesnem pregledu pomešana z obravnavo drugih organskih sistemov. Najdbe moramo sproti povezovati z mehanizmi, ki bi jih lahko povzročili. Le tako razmišljanje bo omogočilo postavitve delovne diagnoze. Šele na tej osnovi se odločimo za morebitne dodatne preiskovane metode (2).

Kljub hitremu tehnološkemu napredku v medicini bo ostala klinična preiskava nenadomestljiva: je poceni, dostopna, hitra, omogoča pogoste zaporedne kontrole, usmerjeno izvajanje dodatnih preiskav in s tem povečuje njihovo napovedno vrednost. Najdbe klinične preiskave pomembno vplivajo na razlago rezultatov dodatnih preiskav. Bistvene so tudi za oceno uspešnosti zdravljenja in za napoved poteka bolezni (2).

1.8.1.2 ENDOSKOPIJA

Endoskopska preiskava je diagnostični postopek za pregled notranjih površin nekaterih votlin drobovni organov in telesnih votlin. Pregled se izvaja z endoskopi. Endoskop je toga ali upogljiva cev z vgrajenim optičnim sistemom vlaken, kateri prevaja sliko in svetlobo. Endoskopi imajo vgrajene kanale za izpiranje in vsrkavanje ter delovne kanale.

- Gastroskopija je preiskava zgornjega dela prebavnega trakta pri kateri zdravnik natančno pregleda sluznico požiralnika, želodca in dvanajsternika. Gastroskopijo izvedemo kadar ima pacient bolečine v zgornjem delu trebuha, bruha, ima težave pri požiranju, krvavi iz zgornjih prebavil, ga peče zgaga (7)
- Kolonoskopija je endoskopska preiskava spodnjega dela prebavil: debelega črevesa in končnega dela tankega črevesa. Kolonoskopijo opravimo kadar ima bolnik

bolečine v spodnjem delu trebuha, ima motnje pri iztrebljanju, krvavi iz spodnjega dela prebavil, izvedba kontrolne kolonoskopije, zaradi ocene stanja že ugotovljene bolezni, zaradi opredelitve sprememb, ki so bile odkrite pri drugih preiskavah, preventivni pregled (Slika 5) (7). Virtualna kolonoskopija je tridimenzionalna računalniška tomografija, ki skupaj s kolonoskopijo omogoča natančno lokalizacijo tumorja v črevesu (2).



Slika 5: Kolonoskopija

1.8.1.3 ULTRAZVOK

Z ultrazvočno preiskavo izpostavimo del telesa visoko frekvenčnim zvočnim valovom za izdelavo slike notranjosti telesa. Ultrazvok ne uporablja ionizirajočega sevanja. Ker so ultrazvočne slike posnete v realnem času, nam pokažejo strukturo in gibanje notranjih organov. Ultrazvok je neinvazivna preiskava, ki pomaga zdravniku pri postavitvi diagnoze (8). Z ultrazvokom lahko odkrijemo večje tumorje v trebuhu ter zasevke v abdominalnih bezgavkah in jetrih (2).

1.8.1.4 ENDOLUMINALNI ENDOSKOPSKI ULTRAZVOK

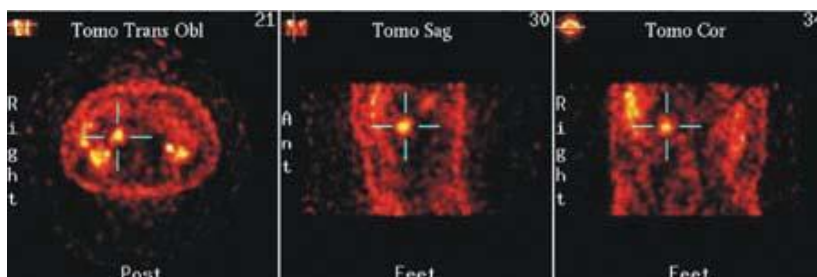
Preiskavo uporabljamo v specializiranih ustanovah za določitev lokalne razširjenosti raka, kar je pomembno pri načrtovanju zdravljenja. Dvojno kontrastno irigografijo zaradi velikega odstotka lažno negativnih rezultatov in zaradi tega, ker ne omogoča histološke potrditve bolezni, le redko uporabljamo v diagnostiki kolorektalnega raka.

Kontraindikacije za irigografijo so vnetne črevesne bolezni ter sum na predrtnje črevesa in ileus (2).

1.8.1.5 POZITRONSKA EMISIJSKA TOMOGRAFIJA (PET)

Princip preiskave temelji na označevanju specifičnih molekul s pomočjo pozitronskih sevalcev. Največ se v svetu uporablja s fluorom označena glukoza (fluordeoksiglukoza – FDG), ki se kopiči predvsem v presnovno aktivnih celicah (tumorjih, akutnih vnetjih). Za prikaz kopičenja potrebujemo posebne detektorje (PET kamere ali koincidenčne gama kamere) (Slika 6) (9).

S pomočjo PET – a lahko prikažemo karcinome trebušne slinavke (občutljivost 82 – 95 %, specifičnost 70 – 90 %), rak debelega črevesa in danke (občutljivost 90 – 100 %, specifičnost 64 – 100 %), karcinome požiralnika (občutljivost 74 %, specifičnost 90 %), limfome in zasevke v jetrih, oz. v trebušni votlini, gastrointestinalne stromalne tumorje (GIST tumorji) (9).



Slika 6: Pozitronska emisijska tomografija

1.8.1.6 SCINTIGRAFIJA

Kadar je mesto krvavitve nedostopno za endoskopske preiskave (tanko črevo), lahko prikažemo mesto krvavitve s pomočjo označenih eritrocitov. Eritrocite lahko označujemo "in vivo" ali "in vitro". Obe metodi imata prednosti in slabosti, pogoj pa je aktivna krvavitev v času preiskave. Kadar je krvavitev občasna, so izvidi pogosto negativni. Ugotovimo lahko krvavitve, ki so obsežnejše od 0,01 mL / min. Običajno snemamo zaporedne posnetke takoj po vbrizgu radiofarmaka, ki nam lahko prikažejo žarišče krvavitve, nato pa še pozne posnetke po več urah, da se prikaže premikanje krvi po črevesu (9).

1.8.1.7 RAČUNALNIŠKA TOMOGRAFIJA (CT)

Računalniška tomografija je neinvazivna preiskava. Računalniška tomografija je kombinacija rentgena z visoko razvitim računalnikom za izdelavo več slik notranjosti telesa (10).

Računalniška tomografija notranjih organov, kosti, tkiva in krvnih žil zagotavlja večjo jasnost in razkrivajo več podrobnosti kot rentgenske preiskave. Z uporabo specializirane opreme in strokovnega znanja za izdelavo in interpretacijo računalniške tomografije telesa, lahko radiologi diagnoze kot so rak, kardiovaskularne bolezni, infekcijske bolezni, vnetje slepiča, poškodb in kostno – mišična obolenja hitreje odkrijejo (10).

1.8.1.8 MAGNETNA REZONANCA (MR)

Magnetna resonanca je neinvazivna preiskava brez ionizirajočega sevanja (2).

Magnetna resonanca je pojav, ko lahko atomskim jedrom v močnem magnetnem polju z radijskimi valovi dovedemo energijo; pogoj je, da uporabimo frekvenco valovanja, ki je enaka frekvenci precesije atomskih jeder (2).

Slikovni del temelji na vodikovih atomih, ki jih je v tkivih veliko. V močnem magnetnem polju jih z radiofrekvenčnim pulzom odklonimo iz ravnovesne lege, nato pulz ugasnemo. Pri vračanju v izhodiščni položaj atomi sami oddajajo radiofrekvenčni signal. Iz jakosti oddanega signala in določitve točke v telesu, kjer je bil izmerjen, računalnik sestavi sliko (2).

1.8.2 LABORATORIJSKE PREISKAVE KRVI

Po splošnih ocenah je več kot 60 % diagnoz postavljenih na osnovi laboratorijskih rezultatov (11). S krvnimi preiskavami ne moremo postaviti diagnoze. Spremembe v kompletni krvni sliki, diferencialni beli krvni sliki in sedimentaciji eritrocitov so neznačilne. Včasih je prvi simptom anemija zaradi pomanjkanja železa, ki nastane zaradi prikrite krvavitve. Običajno je mikrocitna in hipokromna, serumsko železo in feritin sta zmanjšana, TIBC pa povečan (2).

1.8.2.1 TUMORSKI OZNAČEVALCI

Tumorski označevalci (TO) so snovi, ki so produkti malignih celic ali snovi, nastale v drugih celicah pod vplivom delovanja malignih celic. Določamo jih v telesnih tekočinah, najpogosteje v serumu ali plazmi. TO so lahko novosintetizirane snovi, kakršnih v zdravem organizmu ne najdemo, ali snovi, ki so običajno prisotne v veliko manjših koncentracijah. Določanje TO nam lahko pomaga pri diagnozi bolezni, napovedovanju njenega poteka, pri določanju stadija bolezni, izbiri načina zdravljenja ter pri zgodnjem odkrivanju ponovitve in razširitve bolezni. Doslej znani označevalci so zaradi nizke specifičnosti za tkivo, organ in vrsto rakave bolezni ter slabih napovednih lastnosti manj primerni za odkrivanje primarnih rakavih bolezni, zato jih le redko uporabljamo kot presejalno metodo. Poleg tega vseh označevalcev ne uporabljamo z istim namenom; nekateri so primernejši za spremljanje dinamike bolezni, drugi za zgodnje odkrivanje ponovitve bolezni. TO so lahko tudi napovedni dejavniki (11).

TO lahko razdelimo na več načinov: po kemični zgradbi, po mestu nastanka, po vrsti tumorskih bolezni, pri katerih naj bi jih določali. Najpogosteje uporabljana razdelitev poskuša strniti njihove biokemične lastnosti, mesto nastanka in funkcionalnosti. Po tej delitvi ločimo naslednje TO:

- Onkofekalni proteini
- Hormoni in / ali karcinoplacentarni antigeni
- Encimi
- Tumor spremljajoči antigeni
- Posebni serumski proteini
- Mešani označevalci (11)

TO lahko delimo tudi glede na mesto določitve. Humoralni TO so določeni v krvi in ostalih telesnih tekočinah, celični TO pa v celicah ali na površini celic. (11)

Med tumorskimi označevalci se je edino karcinoembrionalni antigen (CEA) pokazal kot klinično sprejemljiv, vendar je povišan le pri 60 % bolnikov s kolorektalnim rakom. Karcinomski antigen 19 – 9 (CA 19 – 9) je pri bolnikih s kolorektalnim rakom manj občutljiv. Povečan je le pri 20 do 40 % bolnikov. Zaradi njune premajhne občutljivosti in

specifičnosti CEA in CA 19 – 9 ne uporabljamo v zgodnji diagnostiki ali kot presejalni test za odkrivanje asimptomatskih bolnikov (12).

1.8.3 METODE ZA DOLOČANJE PRIKRITE KRVI V BLATU

1.8.3.1 PRESEJALNI NESPECIFIČNI TEST (TEST NA PRIKRITO KRI V BLATU NA PODLAGI GVAJAK SMOLE)

Test je oblikovan na kartonski podlagi, impregnirani z gvajak smolo. Hemoglobin iz liziranih eritrocitov v prisotnosti vodikovega peroksida s svojim peroksidaznim delovanjem katalizira oksidacijo gvajak smole, s katero je premazan filter papir na testu. Pri tem nastane med fenolno komponento α -gvajak kisline in vodikovega peroksida visoko konjugirana modro obarvana kinonska struktura, ki je sorazmerna s koncentracijo hemoglobina v vzorcu. Barvno spremembo vizualno odčitamo v 30 sekundah po nanosu razvijalne raztopine (13). Lažno pozitivni rezultati se pojavijo, če pacient jemlje določena zdravila ali pri pacientih, ki uživajo manj kuhano rdeče meso, repo in hren, ki vsebujejo peroksidazo. Visoke doze vitamina C povzročajo lažno negativne rezultate. Vzorci za to metodo so lahko rehidrirani za povečanje občutljivosti na račun specifičnosti in pozitivne napovedne vrednosti (15).

Presejanje z testom na podlagi gvajak smole (G – FOBT) zniža incidenco raka na debelem črevesu od 17 % do 20 %, in umrljivost zaradi raka od 16 % do 33 %. Prednosti vključujejo:

- Zasebnost
- Neinvazivnost
- Stroškovna učinkovitost

Slabosti vključujejo:

- Zaradi vizualnega odčitavanja rezultata subjektivna interpretacija lahko vpliva na rezultat
- Omejena občutljivost
- Potrebo po periodičnem testiranju
- Nizka specifičnost (visoka vrednost lažno pozitivnih rezultatov); test reagira z nečloveškim hemom v hrani in krvi iz zgornjega gastrointestinalnega trakta.

- Potrebna je predhodna dieta (15)

1.8.3.2. IMUNOLOŠKI KVALITATIVNI TEST

S testiranjem z imunološkim kvalitativnimi testi ni več potrebna dieta pred testiranjem ali med testnim obdobjem, saj je metoda specifična za človeški hemoglobin. To dosega večjo skladnost, skupaj z izboljšano natančnostjo (18). Na tržišču obstaja veliko različnih testov različnih proizvajalcev:

- ImmoCARE – C (CARE Diagnostica)
- Hem – Check (Vedelab)
- Faecal Occult Blood Test Cassette (Ulti med)
- FOB Test (Dialab);

Zaradi različnih protiteles (oz. prijemališč teh protiteles na molekulo Hb), ki se uporabljajo v teh testih in različne analitične občutljivosti teh testov so med seboj težko primerljivi.

Klinične raziskave so pokazale, da se z znižanjem zahtevane stopnje dokazov (količina prisotnega hemoglobina v blatu) podvoji stopnja uspešnosti odkrivanja polipov, zato je metoda še posebej učinkovita za zgodnje odkrivanje (18).

Slabosti imunoloških kvalitativnih testov:

- Mejna vrednost je določena s strani proizvajalca in je ne moremo spreminjati
- Zaradi vizualnega odčitavanja rezultatov, subjektivna interpretacija lahko vpliva na rezultat.

1.8.3.3 IMUNOLOŠKI KVANTITATIVNI TEST

Imunološki testi za določevanje prikrite krvi v blatu so bili razviti za izboljšanje specifičnosti in odstranitev potrebe po dieti. Uporabljajo enega ali več monoklonskih ali poliklonskih protiteles za detekcijo človeškega hemoglobina. Kvantitativni imunološki test na prikrito kri v blatu (I – FOBT) ima pomembno prednost: omogoča nastavitev mejne pozitivne koncentracije, ki ustreza bolnikovim kliničnim značilnostim. Na primer: starejši moški, ki bi se rad izognil kolonoskopiji zaradi tveganja zapletov med pregledom in ima potencialne koristi detekcije raka zaradi njegove omejene življenjske dobe. Z izbiro višje mejne vrednosti hemoglobina v blatu za pozitiven rezultat bi povečali specifičnost testa,

kateri bi zmanjšal možnost lažno pozitivnega rezultata. Zmanjšal bi občutljivost. Druga možnost uporabe I – FOBT je kot neinvazivna možnost za ljudi, ki lahko obravnavajo kolonoskopijo kot njihovo edino možnost. V tem primeru bi bilo potrebno izbrati mejno pozitivno koncentracijo, ki ima 90 % občutljivost za raka, ali višjo, in za omejitev te strategije se bolnikom z nizko verjetnostjo zagotovi, da negativen rezultat bistveno izključuje raka. Izbira višje mejne koncentracije za hemoglobin v blatu za pozitivne rezultate bi povečalo specifičnost testa, kar bi znižalo možnosti lažno pozitivnih rezultatov. Zmanjšala bi se tudi občutljivost testa (15).

Obstaja več testov različnih proizvajalcev:

OC – Senzor / DIANA, Eiken Chemical Co., Tokio, Japonska;

FOB Gold /SENTIFOB, Sentinel Diagnostics SpA, Milano, Italija;

Preglednica III: Primerjava med OC Senzor analizatorjem in Sentifob analizatorjem

	OC Senzor / DIANA	SENTIFOB
Metoda	Lateksna aglutinacija	Lateksna aglutinacija
Volumen vzorca	35 µL	10 µL
Območje merjenja	50 – 1050 ng / mL pufra	14 – 1000 ng / mL pufra
Merilne celice	Večkratno uporabne kivete	Kivete za enkratno uporabo
Instrumentacija	Namenski stacionarni analizator	Stacionarni analizator (možnost aplikacije na različne biokem. analizatorje)

(16)

Študije opravljene na usposobljenih centrih, so pokazale, da mejna vrednost 50 ng Hb / mL daje 7,8 % indeks pozitivnosti, mejna vrednost 100 ng Hb / mL pa daje 4,5 % indeks pozitivnosti (17). Stopnja pozitivnosti predstavlja število pozitivnih rezultatov preiskovancev kot delež glede na število vseh preiskovancev udeleženih v preiskavi (19). Za diagnostične namene, morajo biti rezultati vedno ocenjeni poleg klinične zgodovine in ostalih kliničnih najdb (17).

Pri kvantitativnih imunoloških testih je omogočeno izvajanje notranje kontrole kvalitete, kar gvajak test in kvalitativni testi ne omogočajo.

2. NAMEN DELA

Dokazovanje prikrite krvi v blatu je presejalna laboratorijska preiskava, ki se uporablja za odkrivanje raka na debelem črevesu. Metoda se uporablja tudi za presejalno testiranje prebivalstva, ponavadi pri pacientih starejših od 50 let in pacientih z različnimi dejavniki tveganja za obolenje za rakom na debelem črevesu. Bolezni, ki povzročajo prikrite krvavitve v blatu je potrebno čim hitreje odkriti, saj je možnost ozdravitve večja pri zgodnjih stadijih bolezni, kot kasneje, ko je bolezen že napredovala.

Za dokazovanje prikrite krvi v blatu se uporabljajo različne metode. Namen dela bo primerjava med kvalitativnim in kvantitativnim določanjem prikrite krvi v blatu.

Ugotavljali bomo katera metoda :

- Je bolj občutljiva
- Je hitrejša
- Je enostavnejša za analitika
- Ima enostavnejše odčitavanje rezultatov

Vzorci bomo analizirali z dvema metodama:

- Kvalitativna metoda: immoCARE - C, proizvajalca CARE diagnostica
- Kvantitativna metoda: FOB Gold, proizvajalca Sentinel diagnostics

3. EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili hospitalizirane preiskovance na različnih oddelkih Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, ali so bili pregledani v različnih ambulantah na Polikliniki Ljubljana, in so imeli naročeno preiskavo kri v blatu (F - kri).

3.2 VZORCI

Pacienti so dobili za odvzem vzorca (blata) plastično posodico z žličko. Pred vzorčenjem dieta ni bila potrebna. Za pregled blata na prisotnost prikrite krvi se priporoča, da preiskovanec odda 3 vzorce blata treh različnih spontanah iztrebljanj. Nekaj dni pred odvzemom vzorca blata se ne sme uživati odvajal ali sredstev proti driski. Sedem dni pred odvzemom vzorca blata ne sme jemati zdravil, ki vsebujejo acetilsalicilno kislino in drugih nesteroidnih zdravil ter kortikosteroidov, razen če ni nujno potrebno. Vzorec odvzame z žličko, nameščeno v pokrovu posodice za blato tako, da zajame blato iz globine iztrebka na vsaj treh različnih mestih. Potrebna količina vzorca je za lešnik blata. Vzorec ni uporaben, če je odvzet ob menstruaciji, če ima preiskovanec krvaveče hemoroide, če krvavi iz nosu ali obzobnih tkiv. V raziskavo smo vključili 1., 1. in 2. ali pa vse tri vzorce blata pri enem pacientu.

3.3 ANALIZA VZORCEV

Vse vzorce smo analizirali s kvalitativno in kvantitativno metodo. Pri obeh metodah smo vzorce analizirali po predpisanih postopkih, in uporabljali vsa zaščitna sredstva med analizo.

3.3.1 KVALITATIVNA METODA ZA DOLOČANJE PRIKRITE KRV V BLATU IMMO CARE - C

ImmoCARE – C je hitri imunokromatografski test za kvalitativno zaznavo človeškega hemoglobina v vzorcih blata.

3.3.1.1 PRINCIP TESTA

Po aplikaciji vzorca se le – ta po principu kapilarnega vleka pomakne do blazinice, ki je prikrita z delci koloidnega zlata, na katera so vezana protitelesa proti človeškemu Hb. V primeru, da je v vzorcu blata prisoten človeški Hb, se le – ta veže z anti- β -človeškimi Hb protitelesi, vezanimi na delcih koloidnega zlata (20). Imunski kompleks, ki skupaj s tekočim ekstraktom blata predstavlja mobilno fazo, s pomočjo kapilarnega vleka potuje po principu tenkoplastne kromatografije po membrani, ki predstavlja stacionarno fazo (21). Ta kompleks potem potuje do linije, na kateri so imobilizirana protitelesa proti človeškemu α - hemoglobinu, kjer se ob prisotnosti človeškega Hb pojavi barva v testni liniji (T). Kot notranja pozitivna kontrola so na blazinico, prekrito z delci koloidnega zlata, vezana tudi druga Pt, ki se neodvisno od prisotnosti človeškega Hb v vzorcu blata premaknejo do drugih Pt. Dobimo rožnato črto na kontrolni liniji (C), ki nam služi kot kontrola za pravilno izvedbo testa (20).

3.3.1.2 POSTOPEK IZVEDBE TESTA

APLIKACIJA VZORCA:

- Odvij pokrovček epruvete za vzorec in drži epruveto pokončno, da se tekočina (pufer) ne izlije
- Paličko, pritrjeno v pokrov potisni v blato na treh različnih mestih. Ne preseži maksimalne točke, ki jo predstavlja konec zarez
- S staničevino predvidno odstrani odvečno blato in pri tem pazi, da se pokrovček ne umaže
- Aplikator vrni v epruveto za vzorec, zamaši z zamaškom in dobro pretresi (22)

ANALIZA TESTA:

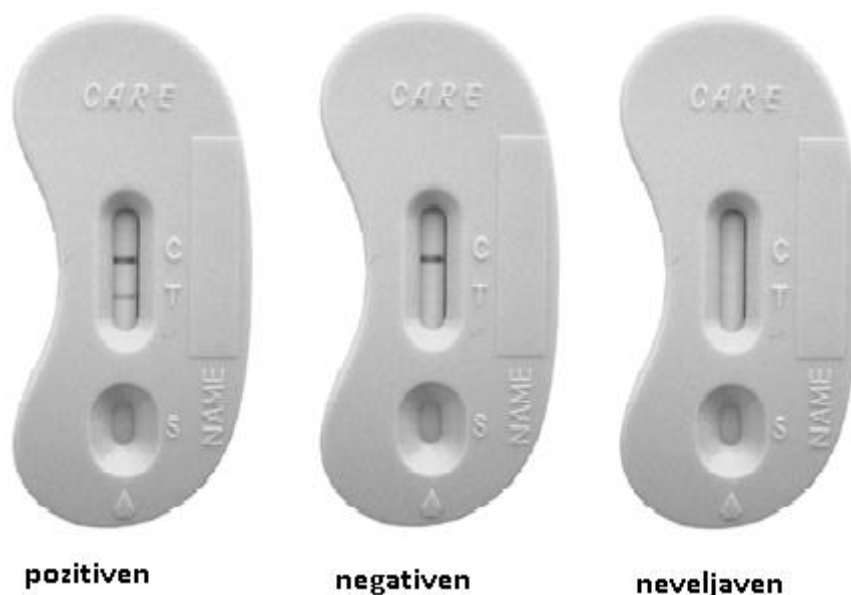
- Vzorec ogrejemo na sobno temperaturo (20 do 25 °C)
- Odstranimo ovoj iz testne kasete tik preden pričnemo s testom
- Pretresemo epruveto s pufrom. S staničevino pokrijemo pokrovček epruvete in ga odlomimo.
- Kanemo dve kapljici iz epruvete v vzorčno polje testne ploščice in se izognemo mehurčkom
- Počakamo pet minut in interpretiramo rezultat (Slika 7) (20).



Slika 7: immoCARE - C

3.3.1.3 INTERPRETACIJA TESTA

Test je pozitiven, če se v petih minutah pojavita rožnati črti na polju T (test) in C (kontrola). Če se pojavi rožnata črta samo na mestu C, pomeni da je test negativen. Rezultat je neveljaven, če se ne pojavi rožnata barva niti na mestu T, niti na mestu C, ali če je celotno polje obarvano rožnato. Če se po petih minutah barva v testnem polju le šibko vidi, počakamo največ deset minut, če tudi po desetih minutah ni izboljšave, test ponovimo z novo testno ploščico (Slika 8). Prav tako je potrebno šibko črto v testni regiji (T) razlagati kot pozitiven rezultat (20).



Slika 8: Interpretacija rezultatov testa immoCARE - C

3.3.1.4 OBČUTLJIVOST TESTA

ImmoCARE - C testi so pokazali pozitiven rezultat pri koncentraciji 0,05 mg Hb /mL pufra (kar ustreza približno 30,0 µg Hb / g blata) (20).

3.3.1.5 INTERFERENCE

Številna zdravila, kot so na primer zdravila, ki vsebujejo acetilsalicilno kislino, glukokortikoidi, nesteroidna protivnetna zdravila ali derivati kumarina lahko povzročijo krvavitev iz prebavil. Test na prikrito krvavitev je mogoča šele nekaj dni kasneje, ko se zdravila odstranijo iz organizma (20).

3.3.2 KVANTITATIVNA METODA ZA DOLOČANJE PRIKRITE KRVIVOSTI V BLATU FOB GOLD

FOB Gold test proizvajalca Sentinel diagnostics je kvantitativni test za določanje človeškega hemoglobina v blatu. Zaradi enostavne uporabnosti na avtomatiziranih analizatorjih klinične biokemije je uporaben za presejanje mnogih stanj v nižjem gastrointestinalnem traktu v povezavi s krvavenjem kot so:

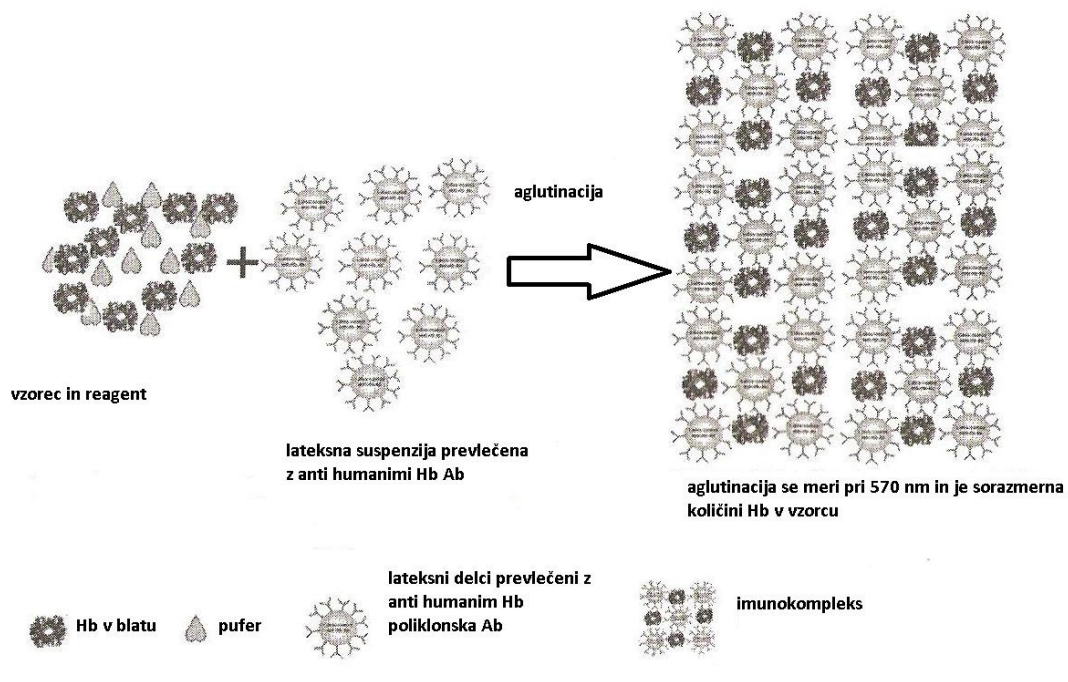
- Rak na debelem črevesu
- Polipi na črevesu
- Chronova bolezen
- Ulcerozni kolitis

Metoda je specifična za človeški hemoglobin in ni potrebna predhodna dieta (17).

3.3.2.1 PRINCIP METODE

FOB Gold test je imunokemična metoda, ki zagotavlja občutljivo, točno in ponovljivo določanje človeškega hemoglobina v vzorcih blata. Temelji na aglutinacijski reakciji antigen – protitelo med človeškim hemoglobinom, prisotnem v vzorcu in poliklonalnimi protitelesi proti človeškemu hemoglobinu, ki so absorbirani na polistirenske delce. Aglutinacija se meri kot povečanje motnosti, ki je sorazmerna količini človeškega

hemoglobina v vzorcu (Slika 9) (17).



Slika 9: Princip reakcije

3.3.2.2 ZBIRALNA EPRUVETA

Vsaka zbiralna epruveta vsebuje 1,7 mL ekstrakcijskega pufra. Kompozicija in koncentracija aktivnih komponent v ekstrakcijskem pufu so:

- Goveji serumski albumin (BSA): 1 %
- Natrijev klorid: < 0,9 %
- Natrijev azid: < 0,1 %
- Stabilizatorji (Slika 10) (17)



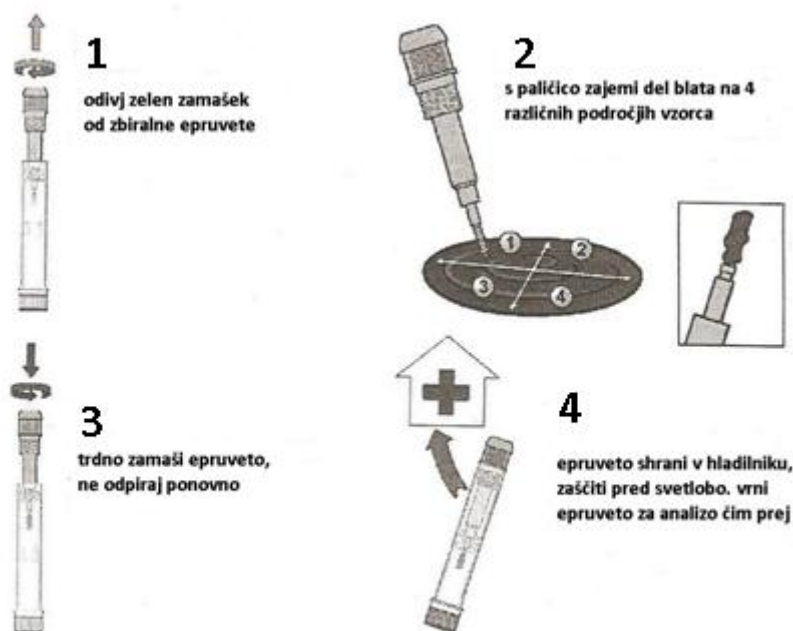
Slika 10: Zbiralna epruveta

Zbiralna epruveta shranjena pri temperaturi od 2 do 30 ° C je stabilna do datuma izteka, ki je napisan na embalaži. Človeški hemoglobin, pridobljen iz vzorca blata in pridobljen v skladu z priporočenimi postopki zbiranja, je stabilen 7 dni v hladilniku in zaščiten pred direktno svetlobo (23).

3.3.2.3 PRIPRAVA VZORCA BLATA:

- Odvijemo pokrovček na epruveti za vzorčenje
- S pomočjo paličastega aplikatorja na pokrovčku (nazobčan del) odvezamemo vzorec blata (potopimo v vzorec blata) na 4 – ih različnih mestih, tako da je zapolnjen navoj na paličici z vzorcem blata
- Paličico ponovno namestimo v epruveto in privijemo pokrovček (Slika 11) (24)

Pred analizo mora vzorec stati najmanj 60 minut. Tako pripravljen vzorec blata je stabilen 7 dni pri temperaturi 2 do 8 °C. (24)



Slika 11: Priprava vzorca v laboratoriju

3.3.2.4 ANALIZATOR SENTIFOB

Analizator Sentifob (Sentinel diagnostics) je namenski analizator za imunokemično kvantitativno določanje skrite krvi v blatu (Slika 12) (25).



Slika 12: Analizator Sentifob

Analizator ima mnoge prednosti:

- Varovalni pokrov omogoča zvočno in proti prašno zaščito ter popoln pregled nad delovanjem analizatorja.
- Možnost uporabe ročnega čitalca črtnih kod za enostavnejši prenos ID številke pacienta v program računalnika
- Tipalo (senzor) za količine tekočin v posodah
- 3 stojala za 24 vzorcev, skupaj 72 vzorcev
- Reakcijski prostor s krožnikom 120 metakrilatnih kivet
- Uporabniku enostaven in prijazen program preko miške in tipkovnice
- Nadzor delovanja preko dnevnik kivet
- Arhiviranje vseh rezultatov, iskanje podatkov preko filtrov
- Dodajanje nadaljnjih vzorcev brez ustavljanja analizatorja (25)

3.3.2.5 DELOVNI POSTOPEK

PRIPRAVA REAGENTOV

Reagent 1 (Good 's pufer pH 8.0, natrijev azid < 0,1 %) in reagent 2 (suspenzija lateksovih delcev prevlečnih s poliklonalnimi protitelesi proti človeškemu hemoglobinu, pH 8.0, natrijev azid < 0,1 %) sta pripravljena za uporabo. Reagenta v neodprtih vialah sta stabilna do datuma uporabnosti odtisnjenega na embalaži. Stabilnost odprte vial: 60 dni pri 2 – 8 °C po odprtju, če ni kontaminirana in če je viala zaprta vsakič po uporabi. Stabilnost odprte vial v analizatorju pri 2 – 12 °C je 28 dni (17).

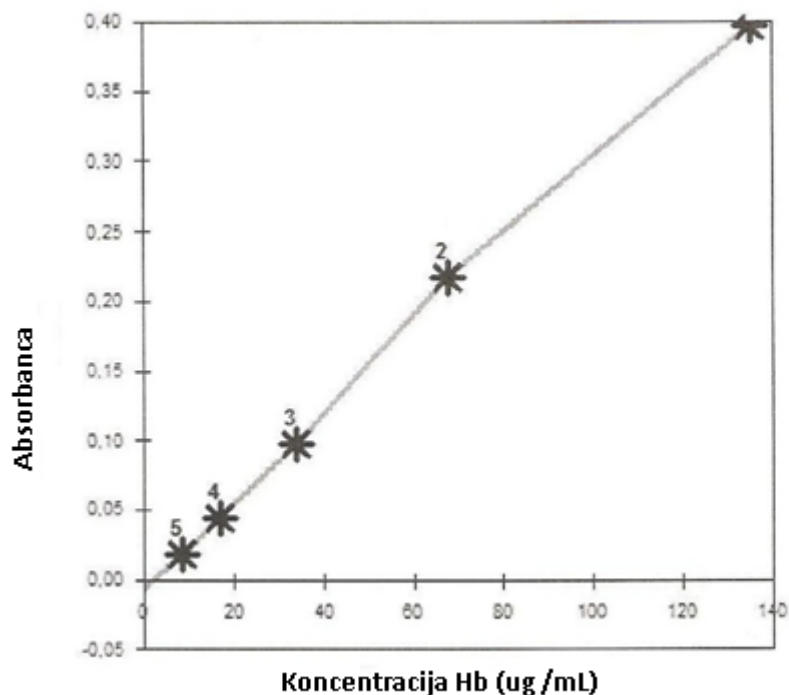
KALIBRACIJA

Liofiliziran kalibrator (FOB Gold calibrator, kataloška številka 11573) vsebuje človeški hemoglobin, koncentracija je označena na nalepki vial. Kalibrator se uporablja za pripravo kalibracijske krivulje (Preglednica IV, Slika 13).

Preglednica IV: Priprava kalibracijske krivulje

Delovni kalibratorji	1	2	3	4	5	6
FOB Gold raztopina za umerjanje	500 µL	500 µL	-	-	-	-
Fiziološka raztopina	-	500	500	500	500	500
Delovni kalibrator 2	-	-	500	-	-	-
Delovni kalibrator 3	-	-	-	500	-	-
Delovni kalibrator 4	-	-	-	-	500	-
Razmerje razredčitve	-	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	-
(hemoglobin) ng / mL	(C)	0,5 x (C)	0,25 x (C)	0,125 x (C)	0,625 x (C)	-

Stabilnost kalibracije v avtomatiziranem analizatorju je vsaj 4 tedne (17).



Slika 13: Primer kalibracijske krivulje

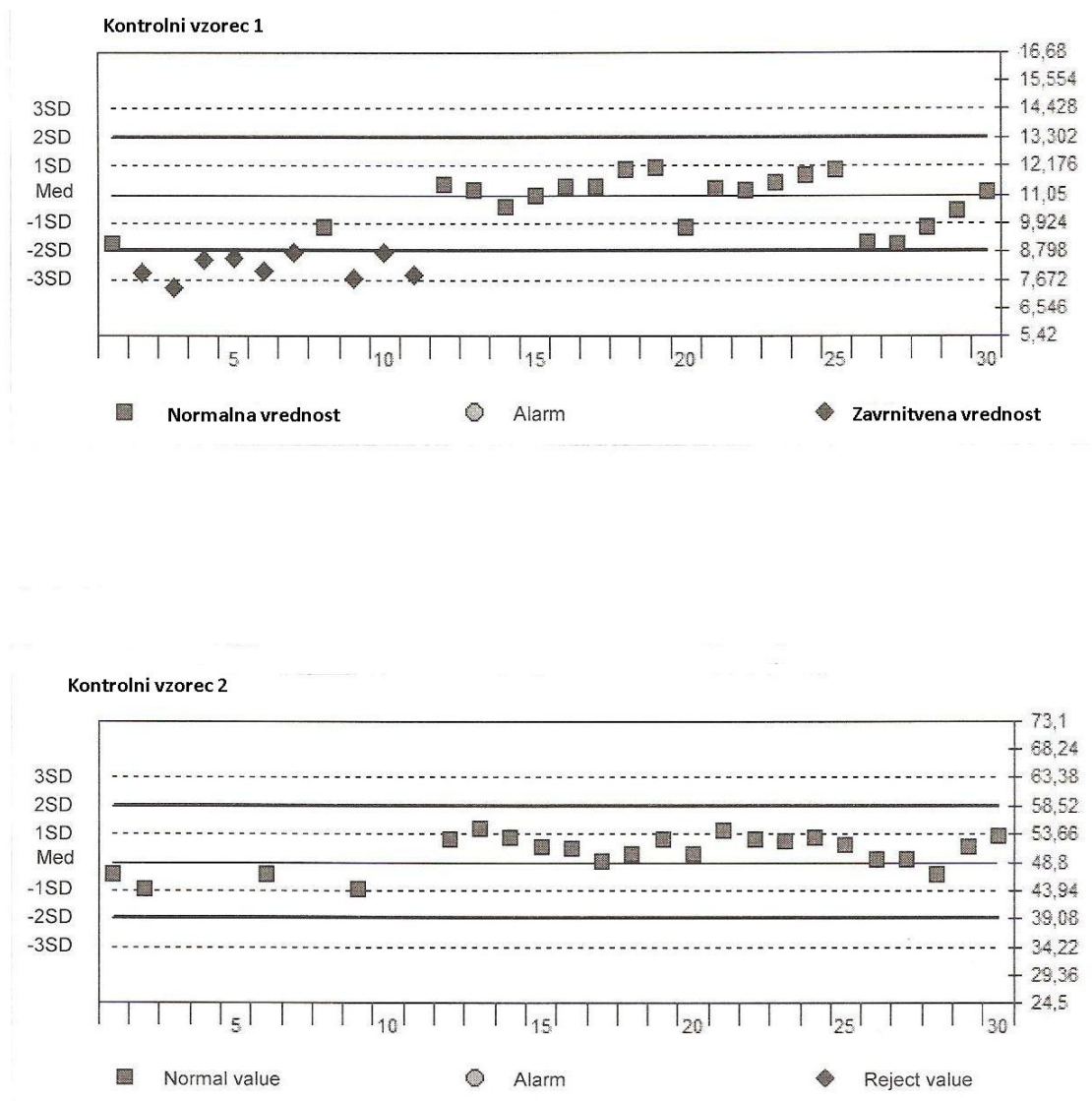
ANALIZA KONTROL

FOB Gold kontroli (FOB Gold control, kataloška številka 11570) je liofiliziran kontrolni material, ki vsebuje človeški hemoglobin in je stabiliziran s konzervansi (26).

Kontroli pripravimo po naslednjem postopku:

- Kontrolni material vzamemo iz hladilnika in počakamo 15 minut na sobni temperaturi
- Odstranimo pokrovček in zamašek, da se izognemo izgubi liofiliziranega materiala in dodamo 2 mL destilirane vode. Nato zamašimo z zamaškom
- Počakamo 10 min in nežno obrnemo za zagotovimo homogenost raztopine
- Odpipetiramo potrebni volumen za analizo (26)

Analiza kontrol se izvaja 1 krat dnevno, merita se dva nivoja: visok in nizek. Meja sprejemljivih rezultatov: ± 2 SD (Slika 14).



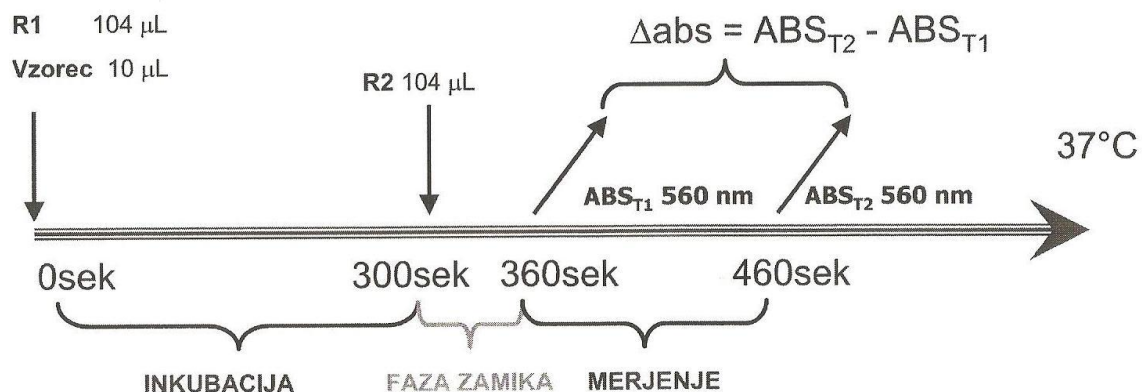
Slika 14: Primer grafičnega prikaza rezultatov kontrolnih vzorcev

ANALIZA VZORCEV:

Na začetku analizator določi bazno linijo na podlagi slepe meritve vode, kar je možno spremljati na ekranu. Postopek je končan približno po treh minutah. Za tem se začne pipetiranje vzorcev. Vzorci pred, med in po delu so različno obarvani, kar vidimo na zaslonu računalnika (27).

- Zbiralne epruvete postavimo v stojalo
- Odstranimo pokrovčke
- Stojalo postavimo v analizator
- Zapremo varnostni pokrov analizatorja
- Pritisnemo start na računalniku, da analizator začne z analizo
- Analizator pipetira vzorec in reagent 1 v kiveto

- Nato pipetira še reagent 2 po 300 sekundah
- Analizator izmeri absorbanco po 60 sekundah
- Ponovno izmeri absorbanco z zamikom 100 sekund
- Rezultat odčitamo iz monitorja računalnika (Slika 15)



Slika 15: Potek reakcije

3.3.2.6 INTERPRETACIJA REZULTATOV

Analizator nam poda rezultat analize v µg Hb / g blata, kar lahko s faktorjem pretvorimo v ng Hb / mL pufra.

3.3.2.7 MEJNA VREDNOST (CUT OFF)

Priporočeno je, da vsak laboratorij sam postavi mejno koncentracijo, glede na populacijo in namena testiranja (na primer presejanje, spremljanje...). Laboratorij ima postavljeno mejno vrednost 8,5 µg Hb / g blata (50 ng Hb / mL pufra). Populacija je simptomatska (17).

3.3.2.8 VZDRŽEVANJE SISTEMA

Dnevno vzdrževanje po končanem delu:

- Spiranje analizatorja pred delom
- Steklениčke z reagenti zapremo in postavimo v hladilnik
- Krožnik s kivetami odstranimo iz analizatorja
- Spiranje analizatorja po delu
- Izklop računalnika (27)

Tedensko vzdrževanje:

- Čiščenje igle pipetorja in kovinske ploščice (27)

Mesečno vzdrževanje:

- Čiščenje sistema z 1,5 % raztopino Na hipoklorita (27)

Ostali postopki:

- Menjava krožnika s kivetami
- Menjava ali dolivanje sistemske tekočine ali čistilne tekočine (27)

3.4 STATISTIČNE METODE

Grafično smo prikazali število preiskovancev glede na spol, povprečno starost glede na spol in število pozitivnih in negativnih rezultatov pri immoCARE – C in FOB Gold metodi. Rezultate smo statistično obdelali s programom SPSS Statistics 17.0. Statistično smo primerjali immoCARE – C metodo in FOB Gold metodo. Statistično smo ugotavljali, če spol in starost preiskovancev vpliva na pozitiven rezultat, in izračunali smo % ujemanja rezultatov med seboj. % ujemanja rezultatov smo izračunali po naslednjih formulah:

$$\% \text{ ujemanja} = \frac{a + d}{(a + b + c + d)} \times 100 \%$$

Enačba 2: % ujemanja rezultatov

$$\% \text{ ujemanja pozitivnih rezultatov} = \frac{a}{(a + c)} \times 100 \%$$

Enačba 3: % ujemanja pozitivnih rezultatov

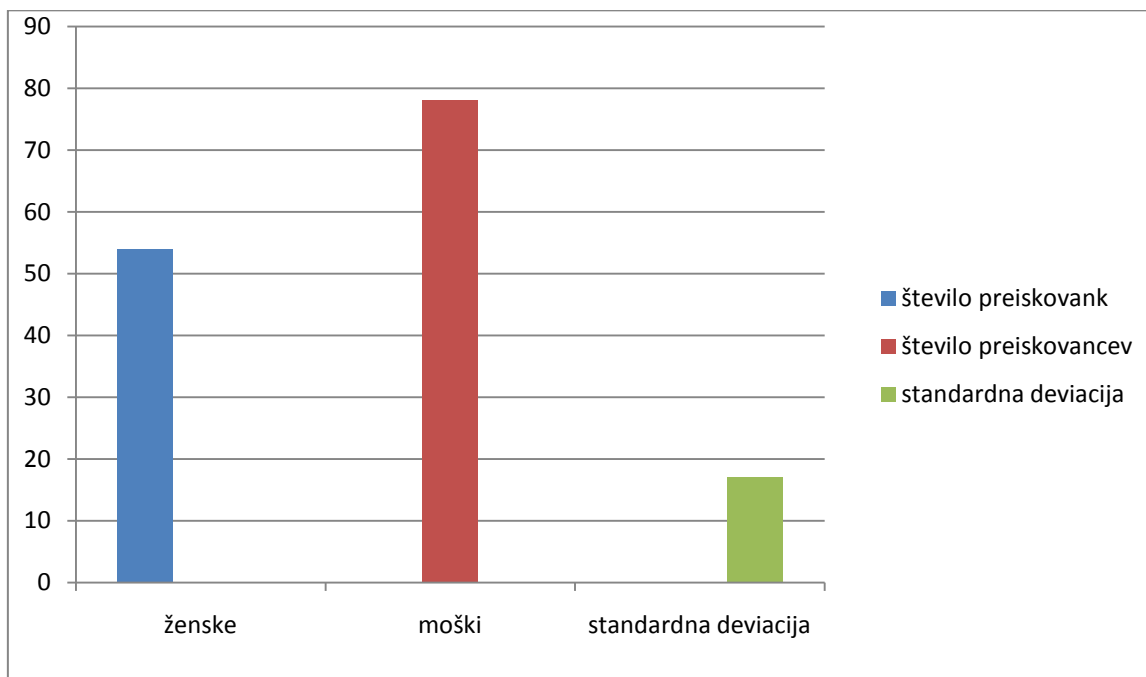
$$\% \text{ ujemanja negativnih rezultatov} = \frac{d}{(b + d)} \times 100 \%$$

Enačba 4: % ujemanja negativnih rezultatov (28)

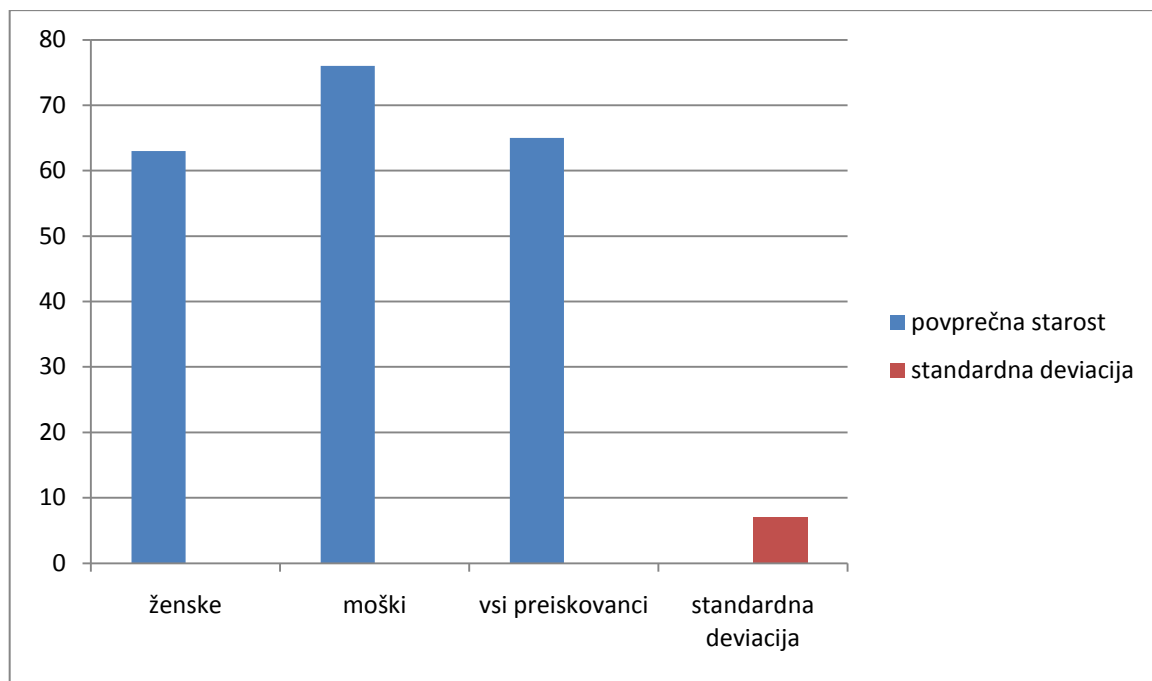
4. REZULTATI

4.1 OPIS PREISKOVANCEV

V raziskavo smo vključili 132 preiskovancev, od tega je bilo 54 preiskovancev ženskega spola in 78 preiskovancev moškega spola (Slika 16). Povprečna starost preiskovancev je bila 64,2 let. Povprečna starost ženskih preiskovank je bila 62,2 let, in povprečna starost moških preiskovancev je bila 66,2 let (Slika 17).

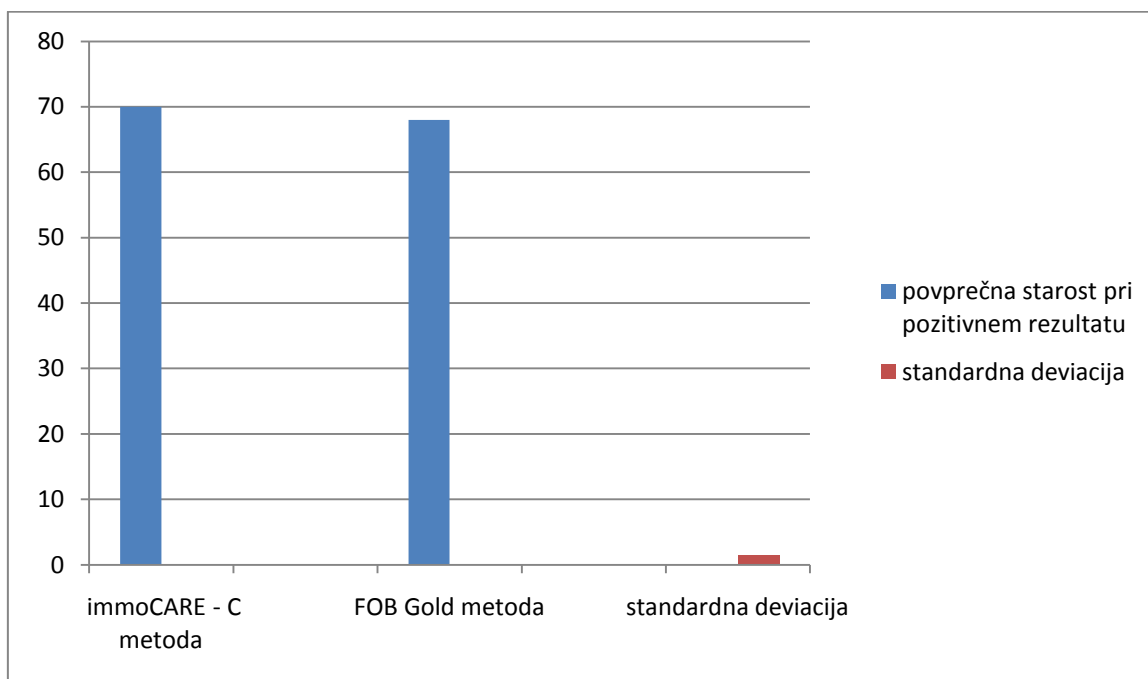


Slika 16: Grafični prikaz števila preiskovancev udeleženi v raziskavi glede na spol in standardna deviacija



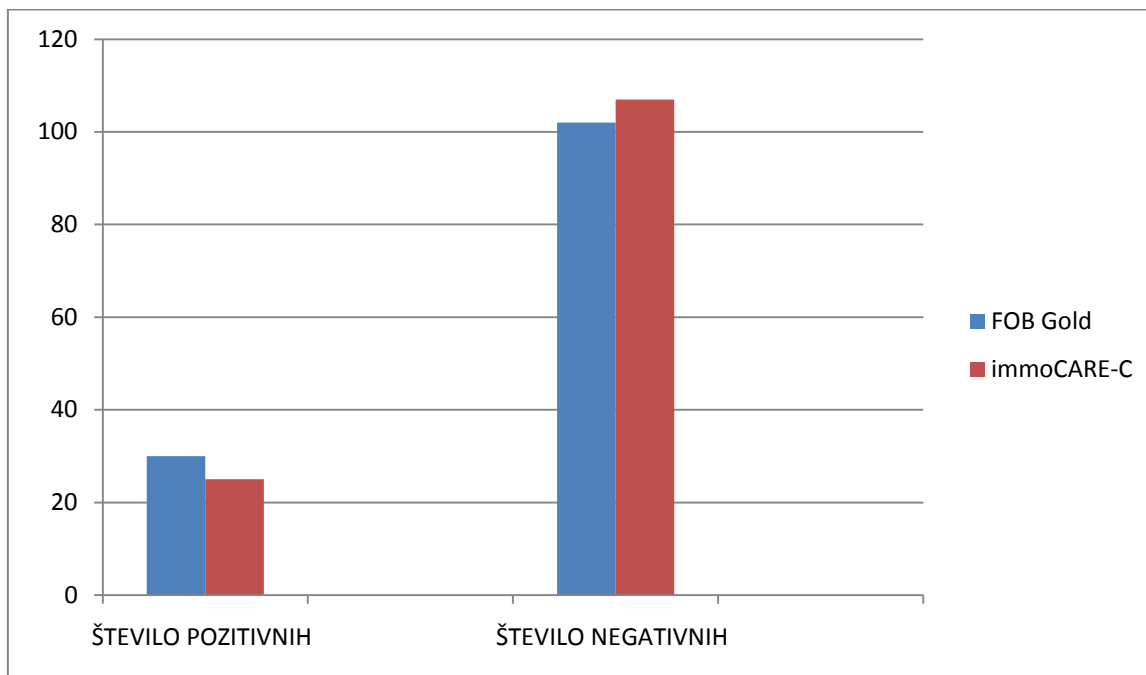
Slika 17: Grafični prikaz povprečne starosti preiskovancev glede na spol in standardna deviacija

Povprečna starost preiskovancev s pozitivnim kvalitativnim testom ImmoCARE – C je bila 70 let, in povprečna starost preiskovancev s pozitivnim kvantitativnim testom FOB Gold je bila 68 let (Slika 18).



Slika 18: Grafični prikaz povprečne starosti preiskovancev pri pozitivnem rezultatu immoCARE – C in FOB Gold metode in standardna deviacija

Slika 19 prikazuje število pozitivnih in negativnih rezultatov pri metodi FOB Gold in immoCARE – C, kjer je razvidno, da je negativnih rezultatov občutno več kot pozitivnih.



Slika 19: Grafični prikaz števila pozitivnih in negativnih rezultatov pri metodi FOB Gold in immoCARE-C

Da smo lahko rezultate primerjali med seboj smo tudi rezultate pridobljene s kvantitativno metodo (FOB Gold) pretvorili v kvalitativno. Mejna koncentracija za pozitiven rezultat je bila 8,5 $\mu\text{g Hb} / \text{g blata}$ (Preglednica V).

Preglednica V: Rezultati preiskave z immoCARE – C in FOB Gold metodo

ZAPOREDNA ŠTEVILKA	STAROST	ImmoCARE – C (poE)	SENTIFOB (poE)	SENTIFOB ($\mu\text{g Hb} / \text{g blata}$)
1	47	0	0	< 3
2	8	1	1	90,9
3	33	0	0	< 3
4	33	0	0	< 3
5	73	0	0	< 3
6	77	0	0	< 3
7	79	0	0	< 3
8	73	1	1	17,4
9	24	0	0	5,3
10	72	0	0	< 3
11	71	0	0	< 3
12	71	0	0	< 3
13	73	0	0	< 3
14	31	0	0	< 3

15	31	0	0	< 3
16	55	0	0	< 3
17	80	0	0	< 3
18	89	0	0	< 3
19	80	0	0	< 3
20	85	0	0	< 3
21	80	0	0	< 3
22	84	0	0	< 3
23	61	1	0	< 3
24	69	1	1	39,2
25	36	0	0	< 3
26	36	0	0	< 3
27	36	0	0	< 3
28	86	0	0	< 3
29	79	0	0	< 3
30	75	0	0	4,30
31	86	0	0	< 3
32	86	0	0	< 3
33	61	1	0	5,90
34	75	0	0	< 3
35	53	0	0	< 3
36	85	0	0	< 3
37	35	0	0	< 3
38	63	0	0	< 3
39	30	0	0	< 3
40	61	0	0	< 3
41	78	0	0	< 3
42	44	0	0	< 3
43	74	1	1	99,50
44	81	0	0	< 3
45	86	0	0	< 3
46	63	0	0	3,20
47	74	0	0	< 3
48	82	0	0	< 3
49	77	0	1	18,90
50	53	0	0	< 3
51	49	0	0	4,70
52	65	0	0	< 3
53	81	0	0	< 3
54	50	0	0	3,60
55	49	0	1	8,90
56	57	0	0	< 3
57	73	0	0	< 3
58	50	0	1	34,90
59	78	0	0	< 3
60	50	0	0	< 3

61	50	0	1	23,40
62	63	0	0	< 3
63	81	0	0	< 3
64	57	0	0	< 3
65	73	0	0	< 3
66	4	1	1	149,80
67	62	0	0	< 3
68	52	1	1	75,40
69	52	0	0	< 3
70	78	0	0	< 3
71	52	0	0	< 3
72	14	0	0	< 3
73	58	0	0	7,50
74	58	0	0	< 3
75	58	0	0	< 3
76	78	0	0	3,30
77	63	0	0	8,00
78	44	0	0	< 3
79	62	0	0	< 3
80	80	0	0	< 3
81	80	1	1	141,20
82	86	1	1	138,10
83	79	1	1	137,90
84	86	0	0	< 3
85	44	0	1	12,20
86	69	1	1	16,60
87	80	1	1	16,80
88	75	0	0	4,70
89	78	0	0	< 3
90	71	1	1	32,10
91	80	1	1	8,80
92	69	1	1	> 150
93	53	0	0	< 3
94	79	0	0	< 3
95	73	0	0	3,40
96	53	0	0	< 3
97	74	0	0	< 3
98	53	0	0	< 3
99	81	0	0	< 3
100	81	0	0	< 3
101	60	1	1	51,90
102	81	1	0	3,60
103	9	0	0	4,70
104	41	0	0	< 3
105	73	0	0	< 3
106	80	0	1	13,20

107	86	1	1	140,80
108	86	1	1	28,40
109	84	1	1	33,20
110	71	0	0	< 3
111	86	1	1	> 150
112	86	1	1	24,20
113	78	0	0	4,30
114	53	0	0	3,40
115	78	0	0	3,00
116	34	0	0	< 3
117	74	0	1	30,70
118	83	1	1	> 150
119	49	0	0	2,70
120	49	0	0	< 3
121	78	0	0	< 3
122	78	0	0	3,10
123	78	0	0	< 3
124	73	0	0	< 3
125	61	0	0	< 3
126	64	0	0	< 3
127	79	1	1	135,50
128	74	0	0	< 3
129	57	0	0	< 3
130	49	0	0	< 3
131	55	0	0	< 3
132	74	0	1	44,20

4.2 STATISTIČNA PRIMERJAVA IMMO CARE – C IN FOB GOLD METODE

S pomočjo statističnega programa SPSS 17.0 smo izračunali statistične teste za primerjavo med immoCARE – C in FOB Gold (Preglednica VI).

Preglednica VI: Statistični parametri primerjave obeh metod

STATISTIČNI PARAMETRI	VREDNOST
Kontingenčni koeficient	0,601
Koeficient korelacije ranga po Spearmanu	0,753

Kontingenčni koeficient je Chi – kvadrat merjen na osnovi odnosa med dvema kategoričnima spremenljivkama. Prednost pred normalnim Chi – kvadratom je v tem, da je lažje interpretiran, saj je razpon vedno omejen z 0 in 1 (kjer 0 pomeni popolno neodvisnost). Slabost tega statističnega testa je ta, da je njegova specifična zgornja meja omejena z velikostjo tabele. Kontingenčni koeficient lahko doseže mejo 1 samo, če je

število kategorij neomejena. Pomembna pomankljivost izračuna kontingenčnega koeficienta je ta, da izračuni niso primerni za jasne interpretacije v smislu verjetnosti ali "delež variance", kot na primer pri Pearson r testu. Ni splošno sprejeto merilo razmerja med kategorijami, ki imajo jasno interpretacijo (29).

Koeficient korelacije ranga po Spearmanu je neparametrična alternativa Pearsonovemu korelacijskemu koeficientu ter ima značilne prednosti in pomanjkljivosti neparametričnih metod. Podobno kot Pearsonov koeficient korelacije ima tudi koeficient korelacije ranga vrednost od -1 do $+1$. Statistično značilnost korelacije računamo s testom t (30).

Glede na izračunane parametre lahko rečemo, da sta metodi srednje povezani med seboj, saj je vrednost kontingenčnega koeficienta 0,601, in vrednosti Spearmanove korelacije 0,753.

% UJEMANJA REZULTATOV

Iz podatkov rezultatov smo izračunali % ujemanja rezultatov, % ujemanja pozitivnih rezultatov in % ujemanja negativnih rezultatov. Negativne rezultate smo ovrednotili kot 0, in pozitivne rezultate kot 1. Rezultate smo razvrstili v skupine glede na pozitiven ali negativen rezultat, ki smo jih dobili z analizo immoCARE-C in FOB Gold metodo (Preglednica VII).

Preglednica VII: Skupine preiskovancev glede na rezultate

ImmoCARE – C	FOB Gold	FOB Gold	SKUPAJ	DELEŽ
/	POZ	NEG	/	/
POZ	(a) 22	(b) 3	25	18,9 %
NEG	(c) 8	(d) 99	107	81,1 %
/	30	102	132	100 %

Rezultati se po izračunu % ujemanja rezultatov ujemajo dobro (91,6 %), prav tako se dobro ujemajo tudi negativni rezultati (97,1%), saj so samo 3 vzorci lažno pozitivnih rezultatov pri immoCARE - C metodi. Vzroki za lažno pozitivne rezultate so naslednji: razlika pri vzorčenju oz. nehomogena razporejenost hemoglobina v vzorcu blata, acetilsalicilna kislina, glukokortikoidi, derivati kumarina in nesteroidna protivnetna zdravila (2).

% ujemanja pozitivnih rezultatov se ujema slabše (73,3%), saj je kar 8 vzorcev lažno negativnih pri immoCARE – C metodi (Preglednica VIII). Vzroki za lažno negativne rezultate immoCARE – C metode je slabša občutljivost ImmoCARE – C metode v primerjavi s FOB Gold metodo. Koncentracija Hb / g blata pri teh vzorcih je od 8,9 $\mu\text{g Hb / g blata}$ do 44,2 $\mu\text{g Hb / g blata}$, občutljivost ImmoCARE – C metode pa je približno 30,0 $\mu\text{g Hb / g blata}$. Ta podatek nam pojasni lažno negativne rezultate pri immoCARE – C metodi, čeprav bi moral biti po tem podatku vzorec z vrednostjo 44,2 $\mu\text{g Hb / g blata}$ pozitiven.

Preglednica VIII: Rezultati izračuna % ujemanja rezultatov

% ujemanja	Procenti
% ujemanja rezultatov	91,6 %
% ujemanja pozitivnih rezultatov	73,3 %
% ujemanja negativnih rezultatov	97,1 %

4.3 STATISTIČNA PRIMERJAVA IMMO CARE – C, FOB GOLD METODE IN SPOLA PREISKOVANCEV

Podatke smo zbrali v skupine glede na spol in rezultat pri immoCARE – C in FOB Gold metodi (Preglednica IX, Preglednica XI), da ugotovimo, če spol kako vpliva na rezultat obeh metod. Izračunali smo tudi delež preiskovancev (Preglednica X).

Preglednica IX: Skupine preiskovancev glede na spol in rezultat pri immoCARE – C metodi

SPOL	ImmoCARE-C	ImmoCARE - C	SKUPAJ
	NEGATIVNO	POZITIVNO	
MOŠKI	70	8	78
ŽENSKI	37	17	54
SKUPAJ	107	25	132

Preglednica X: Delež preiskovancev glede na spol pri immoCARE- C metodi

SPOL	DELEŽ NEGATIVNIH	DELEŽ POZITIVNIH	SKUPAJ %
MOŠKI	53,0 %	6,1 %	59,1 %
ŽENSKI	28,0 %	12,9 %	40,9 %
SKUPAJ	81,0 %	19,0 %	100 %

Najštevilčnejša skupina preiskovancev glede na spol so moški z negativnim rezultatom pri immoCARE – C metodi in sicer 53,0 %. Sledi skupina negativnih rezultatov pri ženskah z 28,0 %. Na tretjem mestu je skupina pozitivnih rezultatov pri ženskah z 12,9 %, najmanj je moških preiskovancev s pozitivnim rezultatom, in sicer 6,1 %.

Preglednica XI: Skupine preiskovancev glede na spol in rezultat pri FOB Gold metodi

	FOB Gold	FOB Gold	SKUPAJ
	NEGATIVNO	POZITIVNO	
MOŠKI	65	13	78
ŽENSKI	37	17	54
SKUPAJ	102	30	132

Preglednica XII: Delež preiskovancev glede na spol pri FOB Gold metodi

SPOL	DELEŽ NEGATIVNIH	DELEŽ POZITIVNIH	SKUPAJ %
MOŠKI	49,2 %	9,8 %	59,0 %
ŽENSKI	28,0	12,9 %	40,9 %
SKUPAJ	77,2	22,8 %	100 %

Najštevilčnejša skupina preiskovancev pri FOB Gold metodi je skupina moških z negativnim rezultatom z deležem 49,2 %, kar je za 3,8 % manj kakor pri immoCARE – C metodi. Delež ženskih preiskovank z negativnim in pozitivnim rezultatom je isti kot pri immoCARE – C metodi, in sicer negativen rezultat 28,0 % in pozitiven rezultat 12,9 %. Delež pozitivnih rezultatov pri moških je 9,8 %, kar je za 3,7 % več kakor pri immoCARE – C metodi (Preglednica XII).

Preglednica XIII: Statistični parametri za obe metodi glede na spol

Statistični parametri	ImmoCARE-C	FOB Gold
	Vrednost	Vrednost
Kontingenčni koeficient	0,257	0,171
Korelacijski koeficient ranga po Spearmanu	0,266	0,174

Najštevilčnejša skupina preiskovancev s pozitivnim rezultatom so ženske pri ImmoCARE – C in FOB Gold metodi. Izračunani statistični parametri te hipoteze ne potrjujejo, saj so vsi koeficienti zelo nizki (Preglednica XIII). Ugotovili smo, da spol ne vpliva na simptom prikrite krvavitve v blato.

4.4 STATISTIČNA PRIMERJAVA IMMO CARE – C, FOB GOLD METODE IN STAROSTI PREISKOVANCEV

V Preglednici XIV smo preiskovance razvrstili v razrede glede na starost, da bi ugotovili pri kateri starosti se simptom prikrite krvavitve v blatu najpogosteje pojavi.

Preglednica XIV: Skupine preiskovancev glede na starost in delež preiskovancev

RAZRED	LETA	ŠTEVILO PREISK.	DELEŽ PREISK.	POZITIVEN REZULTAT FOB GOLD	POZITIVEN REZULTAT IMMO CARE- C
1	0 – 10	3	2,4 %	2	2
2	11 – 20	1	0,7 %	0	0
3	21 – 30	2	1,6 %	0	0
4	31 – 40	9	6,8 %	0	0
5	41 – 50	14	10,7 %	4	0

6	51 – 60	18	13,7 %	2	2
7	61 – 70	15	11,5 %	3	5
8	71 – 80	47	35,2 %	12	9
9	81 – 90	23	17,4 %	7	7
SKUPAJ	/	132	100 %	30	25

S pomočjo statističnega programa SPSS 17.0 smo izračunali statistične parametre s katerimi ugotovimo ali starost vpliva na pozitiven rezultat (Preglednica XV).

Preglednica XV: Statistični parametri za obe metodi glede na starost

METODA	STATISTIČNI PARAMETER	VREDNOST
ImmoCARE – C	Koeficient korelacije ranga po Spearmanu	0,139
FOB Gold	Koeficient korelacije ranga po Spearmanu	0,095

Po podatkih zbranih v Preglednici XIV razberemo, da je najštevilčnejša populacija s simptomom prikrite krvavitve v blatu med 71. in 80. letom starosti. Koeficient korelacije ranga po Spearmanu (Preglednica XV) je pri metodi FOB Gold in ImmoCARE – C nizek, kar pomeni, da med starostjo preiskovancev in pozitivnim rezultatom testiranja ni nobene povezave, torej starost ne vpliva na pozitiven rezultat.

5. RAZPRAVA

Prikrita kri je v večjih koncentracijah vedno znak bolezni. Vsak človek fiziološko izgubi nekaj krvi, ki je prikrita v blatu in ta koncentracija krvi v blatu je normalna. To je do 3 mL krvi na dan ali 2,42 mg Hb na gram blata (4). Vsaka izguba krvi, večja od te vrednosti, je posledica patoloških sprememb v črevesu, vendar ni nujno, da so količine Hb pri bolnikih z rakom vedno nad to vrednostjo. Večje tveganje za krvavitve imajo bolniki s kroničnimi vnetnimi črevesnimi boleznimi, bolniki po operacijah raka na debelem črevesu in danki, potomci staršev z rakom na debelem črevesu in danki in člani družin s hereditarnim neopolipoznim kolorektalnim rakom. Krvavitve iz prebavil so pogost zaplet bolezni prebavil, ki lahko potekajo brez drugih jasnih znakov bolezni. Po načinu nastanka jih ločimo v akutne in kronične; po količini izgubljene krvi v obilne, manjše ali prikrite; po izvoru pa v krvavitve iz zgornjega in spodnjega dela prebavil. Skoraj 85 % vseh krvavitvev iz prebavil izvira iz zgornjega dela prebavne cevi (2).

V raziskavi smo primerjali dve metodi, in sicer immoCARE – C, ki je kvalitativna in FOB Gold, ki je kvantitativna. Ugotovili smo, da je kvantitativna metoda bolj občutljiva od kvalitativne. Prednost kvantitativne metode je tudi v tem, da analizator poda rezultate številčno, medtem ko je kvalitativna metoda imunokromatografski test, in rezultat poda v obarvanosti testne linije na testni ploščici na testu, rezultat interpretiramo kot pozitiven ali kot negativen. Ker vsako človeško oko drugače zaznava barve, je včasih težko zaznati ali je rezultat pozitiven ali negativen v primeru šibkega obarvanja, še posebej, če je analitik neizkušen.

Kar se tiče enostavnosti, sta obe metodi enostavni za analitika. Ko analitik osvoji potrebno znanje o rokovanju z analizatorjem, je delo na analizatorju zelo preprosto. Pri analizatorju je potrebno paziti na reagenčne steklenice in steklenice z odpadno tekočino, da ne preteče rok uporabe, in da je v analizatorju vedno dovolj reagenčne tekočine, saj brez te tekočine analizator ne deluje pravilno. Pri izvedbi kvantitativnega testa analitik ne potrebuje veliko izkušenj, saj je test preprost za uporabo, analitik mora slediti navodilom, ki ga proizvajalec priloži testu.

Pred vzorčenjem ni potrebna dieta, saj sta obe metodi specifični za človeški hemoglobin, in nobena sestavina hrane ne vpliva na reakcijo in rezultate. Pri metodi ImmoCARE - C obstajajo interference, in sicer acetilsalicilna kislina, glukokortikoidi, protivnetna zdravila. Zaradi teh interferenc lahko pride do lažnih pozitivnih ali negativnih rezultatov. Do lažnih pozitivnih ali negativnih rezultatov lahko pride tudi zaradi nepravilnega vzorčenja ali, če ima pacientka menstruacijo.

Velika prednost kvantitativne metode FOB Gold je, da ima omogočeno izvajanje notranje kontrole kakovosti s kontrolnimi vzorci v dveh različnih nivojih. Pri kvalitativnih testih notranja kontrola ni na voljo.

V naši raziskavi smo imeli 132 vzorcev, od tega so bili trije vzorci, s kvalitativno metodo pozitivni, pri kvantitativni metodi pa negativni. Ker je kvantitativna metoda bolj občutljiva kot kvalitativna, lahko te 3 vzorce vrednotimo kot lažno pozitivne, za kar so možni vzroki:

- Različna analitična občutljivost
- Razlika pri vzorčenju oz. nehomogena razporejenost hemoglobina v vzorcu blata
- Acetilsalicilna kislina
- Glukokortikoidi
- Derivati kumarina
- Nesteroidna protivnetna zdravila (2)

Pri statistični obdelavi rezultatov s statističnim programom SPSS Statistics 17.0 smo ugotovili, da se immoCARE – C in FOB Gold metodi med seboj srednje dobro ujemata, kar pomeni, da obstajajo neskladnosti med obema metodama. Med temi neskladnostmi igra največjo vlogo občutljivost obeh metod, saj je FOB Gold metoda bolj občutljiva kot immoCARE – C.

Ko smo izračunali % ujemanja rezultatov, smo ugotovili, da se negativni rezultati obeh metod dobro ujemajo (97, 1 %), pozitivni rezultati se ujemajo slabše (73, 3%). Da se pozitivni rezultati ujemajo slabše lahko pripišemo vzrokom za lažne rezultate (jemanje zdravil, ki vsebujejo acetilsalicilno kislino, protivnetnih zdravil, glukokortikoidom, menstruaciji pri pacientkah, nehomogena razporejenost hemoglobina v blatu).

V naši raziskavi so statistični podatki pokazali, da je 59,1 % preiskovancev moškega spola, ženskih preiskovank je 40,9 %. Največ je negativnih rezultatov, prav tako pri moških kot pri ženskah. Pozitivnih rezultatov pri immoCARE – C metodi je več pri ženskah in sicer 17, pri moških je pozitivnih rezultatov 8. Pri FOB Gold metodi so rezultati pri ženskah isti, pri moških pa je pozitivnih rezultatov 13, negativnih pa 65. Statistični parametri kažejo, da spol ne vpliva na pozitiven rezultat, saj je kontingenčni koeficient pod 0,5.

Statistični parametri kažejo, da starost ne vpliva na pozitiven rezultat, saj so bili preiskovanci simptomatski, ter koeficient korelacije ranga po Spearmanu je nizek pri FOB Gold in ImmoCARE - C, kar pomeni, da ni nobene povezave med starostjo in pozitivnim rezultatom.

V primerjalni študiji, ki so jo izvedli leta 2006 v Združenih državah Amerike so prišli do podobnih rezultatov. Primerjali so dve metodi za določevanje prikrite krvi v blatu in sicer test na podlagi gvajak smole in imunokemični test. Na podlagi rezultatov, ki so jih pridobili z raziskavo 151 pacientov so ugotovili, da je imunokemični test občutljivejši od testa na podlagi gvajak smole, in da imunokemični test občutno zniža število kolonoskopij in stroškov, ki nastanejo pri presejanju prebivalstva (31).

Proizvajalci priporočajo, da vsak laboratorij vzpostavi svojo mejno vrednost za delo, glede na populacijo in namen testiranja (17). Stopnja pozitivnosti predstavlja število pozitivnih rezultatov preiskovancev kot delež, glede na število vseh preiskovancev udeleženih v

preiskavi (19). Študije opravljene na usposobljenih centrih, so pokazale, da mejna vrednost 50 ng Hb / mL daje 7,8 % indeks pozitivnosti, mejna vrednost 100 ng Hb / mL pa daje 4,5 % indeks pozitivnosti (17).

6. SKLEP

Namen diplomske naloge je bila primerjava med kvalitativno ImmoCARE - C in kvantitativno metodo FOB Gold za določevanje prikrite krvi v blatu. Ugotovili smo naslednje:

- Kvantitativna metoda je bolj občutljiva. Občutljivost kvalitativne metode je nižja v primerjavi s kvantitativno metodo
- Pri obeh metodah je potrebna predpriprava vzorca, ki traja več kot eno uro. Sama analiza vzorca pri immoCARE – C metodi do interpretacije rezultata traja 5 minut. Analiza vzorca z metodo FOB Gold traja približno 3 minute.
- Obe metodi sta enostavni za analitika, ko enkrat osvoji potrebno znanje o pripravi vzorca in sami analizi vzorca. Pri kvalitativni metodi je potrebna aplikacija vzorca v polje testa, pri kvantitativni metodi vzorce postavimo v stojalo, stojalo pa vstavimo v analizator
- Obe metodi sta enostavni za odčitavanje. Pri kvalitativni metodi se pojavi rožnata črta na testnem polju (T) v primeru pozitivnega rezultata, pri kvantitativni metodi pa že računalnik sam poda številčno vrednost prisotnega hemoglobina v vzorcu
- Prednost kvantitativne metode je tudi v tem, da analiziramo več vzorcev hkrati, in s tem prihranimo čas, medtem ko s kvalitativno metodo analiziramo samo en vzorec
- Kvantitativna metoda omogoča analizo kontrolnih vzorcev v dveh nivojih, kvalitativna metoda tega ne omogoča
- Nastavljiva mejna vrednost je velika prednost kvantitativne metode, saj lahko vsak laboratorij nastavi mejno vrednost glede na preiskovano populacijo, za razliko od kvalitativne metode, ki ima mejno vrednost določeno s strani proizvajalca
- Omeniti je potrebno tudi ceno posamezne metode. ImmoCARE – C testne kasete so cenejše kot analizator, ki ga potrebujemo za analizo FOB Gold metode, vendar je potrebno upoštevati tudi to, da so testne kasete ImmoCARE – C za enkratno uporabo, medtem, ko analizator Sentifob lahko uporabljamo dolgoročno.

Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo, da je kvantitativna metoda primernejša za določanje prikrite krvi v blatu. Kvantitativna ima mnoge prednosti pred kvalitativno metodo. Glavna prednost metode pred kvalitativno metode je visoka občutljivost metode, saj zazna hemoglobin v vzorcu v nižji koncentraciji kot kvalitativna metoda, kar pomeni,

da s kvantitativno metodo določimo že rahlo povišano koncentracijo hemoglobina v vzorcu, in lahko začnemo z zdravljenjem bolezni že v zgodnjem stadiju.

7. LITERATURA

1. Štiblar Martinčič D., Cör A., Cvetko E., Marš T. Anatomija, histologija, fiziologija. Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2007; 95, 119 – 123, 131 – 134
2. Kocijančič A., Mrevlje F., Štajer D.: Interna medicina, tretja izdaja. Littera picta, Ljubljana, 2005; 54, 101, 488 – 490, 518 – 539
3. Dahmane R. Ilustrirana anatomija. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 1996; 98
4. <http://www.vestnik.szd.si/st6-1/st6-1-29-37.htm> (10. 3. 2011)
5. Kumar P., Clark M. Kumar & Clark Clinical medicine, peta izdaja. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2002; 319
6. Avberšek – Lužnik I. Priporočeni postopki za laboratorijske preiskave blata. Slovensko združenje za klinično kemijo, Ljubljana, 2000; 4
7. http://www.4kclj.si/admin/dokumenti/00000116-0000007f_interna_endoskopija.pdf (23. 3. 2011)
8. <http://www.radiologyinfo.org/en/info.cfm?pg=genus> (23. 3. 2011)
9. <http://www.vestnik.szd.si/st6-s2/st6-s2-037-040.html> (23. 3. 2011)
10. <http://www.radiologyinfo.org/en/info.cfm?pr=bodyct> (23. 3. 2011)
11. Osredkar J. Izbrana poglavja iz klinične kemije. Slovensko združenje za klinično kemijo, Ljubljana, 2008; 92 – 97
12. http://www.revijavita.com/index.php?stevilkavita=69&naslovclanek=Laboratorijska_medicina_v_Sloveniji (3. 4. 2011)
13. Stanbio Laboratory. Navodila za uporabo Hema-Screen testa; 1
14. S. Foran Melanson, J. Petersen, K. B. Lewandrowski: Evidence - Based Practice for Point - of - Care Testing. American Association for Clinical Chemistry, Inc. Washington D.C. 2006; 95 - 98
15. Imperiale T. Quantitative immunochemical fecal occult blood tests: Is it time to go back to the future? *Annals of internal medicine*, 2007; 309 – 310
16. SA Champh, WE Bennitt, CR Brannon, SP Halloran. Evaluation report: Immunochemical faecal occult blood tests. Crown Copyright. 2009; 8
17. Sentinel diagnostics. FOB Gold: kvantitativne imunoturbidimetrične latex določitve človeškega hemoglobina v fekalnih izločkih: navodila proizvajalca; 1
18. <http://www.carediag.de/content.php?cat=2&page=product&id=2> (19. 9. 2011)

19. wildlife1.wildlifeinformation.org/s/00Ref/KeywordsContents/p/positivity_rate.htm
20. CARE diagnostica. immoCARE – C: Navodila proizvajalca.; 1 - 2
21. Konda G.: Ocenjevanje diagnostične uporabnosti dokazovanja prikrite krvavitve v blatu s kvantitativno imunokemijsko metodo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2010: 29
22. CARE Diagnostica. Patient information immoCARE - C
23. Sentinel diagnostics. FOB Gold Tube NG: Collection Tube for the determination of human hemoglobin in feces samples – occult blood FOB – with the FOB Gold methods: Navodila proizvajalca; 1 - 2
24. SOE Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo. SOP Kvantitativno določanje skrite krvi v blatu: SOE Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo; 1 - 3
25. Sentinel diagnostics. Sentifob predstavitev, 2008; 2 – 23
26. Sentinel diagnostics. FOB Gold Control: Controls for the quantitative determination of hman hemoglobin in feces: Navodilo za uporabo; 1
27. Sentinel diagnostics: Navodila za uporabo analizatorja Sentifob; 2 – 10
28. P. E. Garrett PhD, F. D. Lasky PhD, K. L. Meier PhD. User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline – Second Edition: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008
29. <http://www.statsoft.com/textbook/basic-statistics/> (10. 10. 2011)
30. Š. Adamič: Temelji biostatistike. Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani – Inštitut za biomedicinsko informatiko, Ljubljana, 1995; 117 - 122
31. Z. Levi, R. Hazizi, P. Rozen, A. Vilkin, A. Waked, Y. Niv. A quantitative immunochemical faecal occult blood test is more efficient for detecting significant colorectal neoplasia than a sensitive guaiac test. Blackwell Publishing Ltd, 2006; 1359