

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA KAC

**PRIMERJAVA DVEH IZVEDB ENCIMSKO – IMUNSKÉ
METODE ZA DOLOČANJE OKULTNE KRVI V BLATU**

**COMPARISON OF TWO MODIFICATION OF ENZYME –
IMMUNO METHOD FOR THE DETERMINATION OCCULT
BLOOD IN FECES**

Ljubljana, 2013

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom mag. Elizabete Božnar Alič, univ. dipl. biolog., spec. med. biokem. Praktični del magistrske naloge sem v celoti opravila v Laboratoriju za analitiko specialnih telesnih tekočin Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo, Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Borutu Božiču za strokovno pomoč in vodenje pri opravljanju magistrske naloge. Prav tako se zahvaljujem somentorici mag. Elizabeti Božnar Alič pri usmerjanju skozi praktični del magistrske naloge. Zahvala gre tudi vsem zaposlenim v Laboratoriju za analitiko specialnih telesnih tekočin v Ljubljani.

Posebna zahvala gre tudi mojim najbližjim, ki so me v času študija nesebično podpirali in verjeli vame.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm, spec. med. biokem. in somentorstvom mag. Elizabete Božnar Alič, univ. dipl. biolog., spec. med. biokem.

Podpis študentke:

Ljubljana, 2013

Predsednica magistrske komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

Član magistrske komisije: asist. dr. Jurij Trontelj, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK	V
ABSTRACT.....	VI
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
1. UVOD.....	1
1.1 Princip imunokemijske metode za določanje okultne krvi	1
1.2 Hemoglobin.....	2
1.2.1 Razgradnja eritrocitov	3
1.3 Krvavitve iz prebavil	4
1.4 Rak debelega črevesa in danke	5
1.4.1 Epidemiologija	5
1.4.2 Kaj je rak debelega črevesa in danke?	7
1.5 Presejalni program	8
2. NAMEN DELA	10
3. MATERIALI IN METODE	11
3.1 Vzorci.....	11
3.2 Materiali in oprema	11
3.2.1 Reagenti.....	11
3.2.2 Oprema	12
3.2.3 Biokemični analizator	13
3.3 Eksperimentalno delo.....	14
3.3.1 Kalibracija	14
3.3.2 Analiza kontrolnega materiala	15
3.3.3 Analiza vzorcev	16

4. REZULTATI IN RAZPRAVA	17
4.1 PRIMERJAVA KONCENTRACIJ HEMOGLOBINA V PUFRU A IN B V ČASU 0	17
4.1.1 Primerjava srednjih vrednosti, dobljenih s pufrom A in B v času 0	19
4.1.2 Ujemanje rezultatov med pufrom A in B v času 0	20
4.2 PRIMERJAVA KONCENTRACIJ HEMOGLOBINA V PUFRU A IN B PO 14 IN 28 DNEH.....	21
4.2.1 Primerjava srednjih vrednosti, dobljenih s pufrom A in B po 14 in 28 dneih	25
4.2.2 Ujemanje rezultatov med pufroma A in B po 14 in 28 dneih.....	26
4.2.3 Primerjava pufra A in B glede na koncentracijske intervale	27
4.2.4 Primerjava pufra A in B glede na spremembo koncentracije hemoglobina s časom.....	30
4.3 DOLOČITEV PRAŽNE VREDNOSTI PRI IMUNOKEMIJSKI KVANTITATIVNI METODI	33
4.4 KONCENTRACIJA HEMOGLOBINA PO 63. DNEVU	36
5. SKLEP	43
6. LITERATURA.....	45

POVZETEK

Rak debelega črevesa in danke je eden najpogostejših vrst raka v razvitem svetu in je v Sloveniji po pogostosti na drugem mestu. Ker so zgodnji znaki raka na debelem črevesu in danki neznaki, je smiselno uvesti presejalne programe. V Sloveniji je že uveljavljen program Svit, ki temelji na imunokemijski kvantitativni preiskavi okultne krvi v blatu in na kolonoskopiji, v primeru, da je rezultat prej omenjene preiskave pozitiven.

Namen naše naloge je bil primerjati dve izvedbi imunokemijske metode z vidika ohranjanja koncentracije hemoglobina, in sicer med epruveto za vzorčenje s pufrom A, ki se v slovenskem javnem zdravstvenem sistemu že uporablja, in epruveto za vzorčenje s pufrom B z domnevno izboljšano sestavo. Pri tem smo primerjali, kako se ekstrahirani vzorci blata v pufru A in B obnašajo pri sobni temperaturi in pri podaljšanem shranjevanju. V našo raziskavo smo vključili 119 vzorcev blata, ki so ustrezali koncentraciji hemoglobina nad prazno vrednostjo 50 µg/L.

Ničti dan meritev so razlike v koncentraciji hemoglobina med vzorci pri uporabi pufru A in B posledica njune različne sestave. Razlika v srednjih vrednostih znaša 14,7 %. Po 14 in 28 dneh shranjevanja vzorcev smo le-tim ponovno izmerili koncentracijo hemoglobina in ugotovili, da se razlike med rezultati pri uporabi pufru A in B manjšajo. Razlike v srednjih vrednostih so bile po 14 dneh 2,4 % in po 28 dneh 4,7 %. Nihanja med rezultati, dobljenimi s pufrom A in B, torej niso posledica njune sestave, ampak nastanejo zaradi drugih dejavnikov (sestave blata, jemanja zdravil, temperatura shranjevanja vzorcev itd.). Poleg tega smo v raziskavi po 14 in 28 dneh ugotovili tudi trend naraščanja koncentracije hemoglobina v vzorcih blata. Tako je bila po 14 dneh koncentracija hemoglobina v vzorcih s pufrom A značilno večja v 56 vzorcih, pri metodi s pufrom B pa značilno večja v 71 vzorcih. To pomeni, da v tem segmentu pufer B ni optimalni stabilizator, celo nekoliko slabši od pufru A. Toda pri shranjevanju vzorcev (po 14 in 28 dneh) smo pri sobni temperaturi ugotovili tudi padec koncentracije hemoglobina pod prazno vrednostjo. Pri uporabi pufru A smo dobili 8 takšnih vzorcev in pri uporabi pufru B le 2. Iz tega sledi, da je v tem segmentu pufer B zanesljivejši stabilizator hemoglobina kot pufer A, kar pa je z vidika zgodnjega odkrivanja raka tudi odločilno, saj nas pri tem zanima predvsem zmanjšanje števila prezrtih okultnih sledi krvi v blatu.

Ključne besede: imunokemijska kvantitativna metoda, okultna kri v blatu, rak debelega črevesa in danke, presejalni test

ABSTRACT

Cancer of the colon and rectum is one of the most frequent cancers in the Developed world as also in Slovenia too. Because the early signs of the cancer of colon and rectum are unspecific, it makes sense to introduce the screening programs. Slovenia has already adopted the so called Svit programme, which is based on a quantitative immunochemical investigation of occult blood in the stool, and includes colonoscopy for those whose tests are positive. The purpose of our research was to compare the two versions of immunochemical methods, namely the sampling tube with buffer A, which is already used in the Slovenian public health system and another sampling tube with buffer B, which supposed to has an improved composition. By this we extracted sludge samples in buffer A and buffer B and compare how they two behave at the room temperature and at the different time intervals. In our study we included 119 such samples of sludge, which met the hemoglobin concentration with the cut-off value higher than 50 µg/L. The first day of measurement the differences in hemoglobin concentration between samples with buffer A and B were due to their different composition. The difference in mean values were 14,7 %. After 14 and 28 days of storage of these samples we have re-measured their hemoglobin concentration and found that the differences between the results in the use of buffer A and B became smaller. The differences between mean values was 2,4 % after 14 days and 4,7 % after 28 days. It means that oscillations between the results obtained with buffer A and B are not connected with their composition, but caused by other factors (sludge structure, use of medicaments, temperature of the stored samples etc.). Beside we found an upward trend of hemoglobin concentration in stool samples over the time. Thus after 14 day the concentration of hemoglobin in samples with buffer A was significant higher in 56 samples and in the method with the buffer B significant higher in 71 samples. It means that in this case the B buffer is not an optimal stabilizer, it is even worse than buffer A. But we also found that by the storage of samples at the room temperature (after 14 and 28 days), the hemoglobin concentration falls under the cut-off value. By this we found that by the use of buffer A we could found 8 such samples and by the use of buffer B only 2. It follows that in this case the buffer B is better stabilizer than buffer A. For the purpose of early detection of cancer this is also more important, because in this investigation we are much more interested in the lower number of the overlooked samples with occult blood than in the samples that the concentration of the hemoglobin increased.

Key words: quantitative immunochemical method, occult blood, cancer of the colon and rectum, screening tests

Kazalo preglednic

Preglednica I: Podatki o raku na debelem črevesu za leto 2009 v Sloveniji	6
Preglednica II: Podatki o raku na danki za leto 2009 v Sloveniji	6
Preglednica III: Vrednosti kalibracijske krivulje	14
Preglednica IV: Rezultati meritev imunokemijske metode s pufrom A in B v času 0	18
Preglednica V: Primerjava statističnih rezultatov glede na pufer A in B v času 0	20
Preglednica VI: Statistični parametri primerjave pufra A in B v času 0	20
Preglednica VII: Standardni odklon in koeficient variacije pri pufru A in B v času 0	21
Preglednica VIII: Rezultati meritev imunokemijske metode s pufrom A in B po 14 dneh	22
Preglednica IX: Rezultati meritev imunokemijske metode s pufrom A in B po 28 dneh	23
Preglednica X: Primerjava statističnih rezultatov glede na pufer A in B po 14 in 28 dneh	26
Preglednica XI: Statistični parametri primerjave pufra A in B po 14 in 28 dneh.....	26
Preglednica XII: Standardni odklon in koeficient variacije pri pufru A in B po 14 in 28 dneh.....	27
Preglednica XIII: Razporeditev rezultatov po intervalih	28
Preglednica XIV: Variiranje vzorcev glede na prazno vrednost	34
Preglednica XV: Število negativnih rezultatov glede na prazno vrednost hemoglobina.....	35
Preglednica XVI: Rezultati meritev imunokemijske metode s pufrom A in B po 63 dneh	36

Kazalo slik

Slika 1: Pojavnost raka debelega črevesa in danke v Sloveniji	6
Slika 2: Umrljivost zaradi raka na debelem črevesu in danki v Sloveniji	7
Slika 3: Pojavnost raka debelega črevesa in danke pri moških in ženskah v letu 2009	8
Slika 4: Centrifuga.....	12
Slika 5: Biokemični analizator	13
Slika 6: Priprava vzorcev iz ekstrakta blata.....	15
Slika 7: Koncentracija hemoglobina v vzorcih s pufroma A in B v času 0	19
Slika 8: Koncentracija hemoglobina v vzorcih s pufroma A in B po 14 dneh	24
Slika 9: Koncentracija hemoglobina v vzorcih s pufroma A in B po 28 dneh	25
Slika 10: Primerjava koncentracijskih razredov pri pufru A in B v času 0	29
Slika 11: Primerjava koncentracijskih razredov pri pufru A in B v času 14 dni	29
Slika 12: Primerjava koncentracijskih razredov pri pufru A in B v času 28 dni	30
Slika 13: Sprememba koncentracije hemoglobina s časom pri pufru A po 14 dneh	31
Slika 14: Sprememba koncentracije hemoglobina s časom pri pufru A po 28 dneh	32
Slika 15: Sprememba koncentracije hemoglobina s časom pri pufru B po 14 dneh	32
Slika 16: Sprememba koncentracije hemoglobina s časom pri pufru B po 28 dneh	32
Slika 17: Primerjava praznih koncentracij pufra A in B.....	36
Slika 18: Koncentracija hemoglobina v vzorcih s pufroma A in B po 63 dneh	37
Slika 19: Sprememba koncentracije hemoglobina v vzorcu blata s časom pri pufru A	38
Slika 20: Sprememba koncentracije hemoglobina v vzorcu blata s časom pri pufru B	38

1. UVOD

Okultna kri je nepričakovano prisotna kri v blatu. Fiziološka izguba krvi z blatom je od 2 do 3 mL/dan, kar predstavlja 2,42 mg hemoglobina/g blata. Kadar je izguba krvi z blatom povečana, ali kadar je blato pomešano s svetlo krvjo in sluzjo, ali kadar gre za prisotnost temne krvi v blatu, lahko posumimo na raka debelega črevesa in danke [1]. To je izredno zahrbtna bolezen, saj se lahko več let razvija v telesu človeka brez opozorilnih znakov. Bolezenski znaki, ki nakazujejo na raka debelega črevesa in danke, so neznačilni in se kažejo kot bolečine v trebuhu, sprememba ritma odvajanja blata, občutek nepopolne izpraznitve črevesa, slabost in bruhanje. Zato so presejalni programi pomembno orodje za preprečevanje in zgodnje odkrivanje te bolezni. Od leta 2008 poteka v Sloveniji program Svit, ki je zasnovan na imunokemijski kvantitativni metodi, ki zazna človeški hemoglobin v blatu in na presejalnih kolonoskopijah, ki so izvedene, ko je prva preiskava pozitivna [2].

1.1 Princip imunokemijske metode za določanje okultne krvi

Metoda za določanje okultne krvi v blatu je imunokemijska, saj temelji na aglutinacijski reakciji antigena in protiteles, vezanih na polistirenskih delcih lateksa. Antigen predstavlja človeški globin v ekstraktu vzorca blata. Protitelesa so poliklonska in zanje velja, da imajo različno specifičnost in afiniteto za antigen. Poliklonska protitelesa so uporabljena zaradi velikih variacij pri sestavi globulinov in različic pri posameznikih. Pridobljena so z imunizacijo glodalcev (zajci, kunci): antigen, ki ga injiciramo v žival, povzroči, da limfociti B proizvedejo imunoglobuline, specifične za ta antigen, ki jih lahko nato izoliramo iz živalskega seruma. Aglutinacijo izmerimo turbidimetrično, kar pomeni, da merimo padec intenzitete prepuščene svetlobe zaradi motnosti, ko žarek svetlobe potuje skozi suspenzijo delcev. Motnost se meri pod kotom 0° od vpadnega žarka. Analizator daje signal, ko žarek svetlobe naleti na kompleks hemoglobin – protitelo. To pomeni, da se motnost suspenzije vzorca, ki jo izmerimo pri valovni dolžini 660 nm, poveča, in je obratnosorazmerna s koncentracijo človeškega hemoglobina v vzorcu blata [3]. Količina svetlobe, ki jo blokira možna suspenzija delcev, ni odvisna samo od koncentracije, ampak tudi od velikosti delcev [4].

K analiznemu kompletu imunokemijske kvantitativne metode sodijo testne epruvete s pufrom, ki stabilizira molekulo hemoglobina [3]. Pufer je raztopina ene ali več spojin, ki nasprotujejo spremembi pH ob nastanku ali dodatku kislin in baz, ter zadržijo kompleksno obliko proteina. Na pH pufrih raztopin vpliva sprememba temperature in dodatek nevtralnih soli [6]. Kot pufri so pomembni tudi proteini, predvsem tisti z veliko histidina. Če pogledamo iz fiziološkega vidika, tudi hemoglobin, ki vsebuje 36 histidinskih ostankov, sodi k sekundarnemu fiziološkemu pufrskemu sistemu, saj pomaga vzdrževati pH krvi v zelo ozkih mejah okrog 7,4 [5].

1.2 Hemoglobin

Hemoglobin se nahaja v eritrocitih. Po kemijski zgradbi je metaloprotein (vsebuje železo) in kromoprotein (krvi daje rdečo barvo). Glavna funkcija hemoglobina je prenos kisika in ogljikovega dioksida po krvi ter sodelovanje v pufrskem sistemu krvi. Njegova molekulska masa je 64 458 [7].

Hemoglobin je tetramer, sestavljen iz dveh parov polipeptidnih verig, ki jih imenujemo globin, in prostetične skupine hem, ki se poveže z vsako od polipeptidnih verig v hemoglobinu. Globin predstavlja približno 96 % mase hemoglobina in je centralni del molekule. Sestavljen je iz štirih polipeptidnih verig – po dve in dve sta enaki. Polipeptidne verige globina se med seboj razlikujejo po številu in zaporedju aminokislin in jih označujemo z grškimi črkami. Na vsako polipeptidno verigo globina je vezana prostetična skupina – hem, ki je neproteinski del molekule. Hem je sestavljen iz štirih pirolovih obročev, urejenih v protoporfirin, in dvovalentnega železa. Na vsak atom železa se lahko reverzibilno veže ena molekula kisika. To pomeni, da ena molekula hemoglobina prenaša štiri molekule kisika [7]. Glede na kemično zgradbo globina ločimo več različnih vrst hemoglobina. Pri zdravi odrasli osebi so prisotni le hemoglobin A (Hb A), hemoglobin A₂ (Hb A₂) in hemoglobin F (Hb F). Hemoglobin A (Hb A) predstavlja 96 do 98 % delež v eritrocitih in je sestavljen iz dveh verig alfa, ki vsebuje 141 aminokislin in dveh verig beta, ki vsebuje 146 aminokislin – $\alpha_2\beta_2$. V eritrocitih odraslega človeka je še 1,5 do 3,2 % hemoglobina A₂ (Hb A₂), ki je sestavljen iz dveh alfa in dveh delta verig – $\alpha_2\delta_2$. Fetalni hemoglobin (Hb F) pa je sestavljen iz dveh alfa in dveh gama verig – $\alpha_2\gamma_2$ in predstavlja 1 % delež v eritrocitih. Fetalni hemoglobin je vrsta hemoglobina pri plodu v poznem fetalnem obdobju in pri novorojenčkih [8]. Verigi zeta in epsilon sta prisotni samo v embrionalnih hemoglobinih. Mutacije, ki povzročajo zamenjavo aminokislin v verigi, so

odgovorne za nastanek različnih oblik hemoglobina. Motnje, ki jih povzroči sprememba v zgradbi hemoglobina, imenujemo hemoglobinopatije in so kvalitativne spremembe oblike hemoglobina. Opisanih je bilo že več kot 200 različic, prevladujejo pa štiri oblike „mutiranega“ hemoglobina: S, C, E in D. Povečano sintezo posamezne oblike hemoglobina imenujemo talasemija. Talasemije so kvantitativne spremembe hemoglobina. Poznamo dva tipa: α -talasemija se karakterizira z zvišano sintezo α verig, β -talasemija pa s povišano sintezo β verig (povišana sta Hb F in Hb A₂ v razmerju z A). Najpogostejša različica mutirane oblike hemoglobina je hemoglobin S (Hb S), pri katerem najdemo v krvi srpaste eritrocite [8]. Po razpadu eritrocitov v krvi se hemoglobin takoj veže na prenašalce (plazemske proteine), s tem pa se prepreči izguba hemoglobina skozi ledvice. Najbolj znana prenašalca hemoglobina sta haptoglobin in hemopeksin. Haptoglobin je α_2 -glikoprotein, ki ima veliko sposobnost vezave hemoglobina. Na eno molekulo haptoglobina se veže ena molekula hemoglobina. Vezava poteka na paru α in β verig hemoglobina A. α veriga se močnejše veže na haptoglobin kot β veriga. Že v kompleksu se železo oksidira in nastane methemoglobin. Kompleks gre v retikulohistiocitni sistem, kjer se haptoglobin odcepi, hemoglobin pa se pretvori v biliverdin s pomočjo encima hemoksigenaze [7].

1.2.1 Razgradnja eritrocitov

Zreli eritrociti so rdeče, okrogle, sploščene in dvojno vdolbene celice brez jedra. V premeru merijo 7 do 9 μm . Rdečo barvo jim daje rdeče krvno barvilo hemoglobin [8]. Življenjska doba eritrocitov v krvi je 100 do 120 dni. V tem času se zmanjša aktivnost številnih encimov, ki vzdržujejo zgradbo in funkcijo eritrocitov, zmanjšata se elastičnost in površinski naboj membrane, poveča se količina methemoglobina v eritrocitu [8]. Večina eritrocitov (80 do 90 %) razpade ekstravaskularno (vranica) in le od 10 do 20 % jih razpade intravaskularno (kri). Če pride do razpada eritrocitov v krvi, se sprosti hemoglobin v plazmo. Tam se veže na haptoglobin, ki odnese hemoglobin v retikulohistiocitni sistem, kjer ga razgradijo makrofagi. Na ta način se prepreči izgubljanje hemoglobina in železa z urinom. Pri ekstravaskularnem razpadu eritrocitov ima glavno vlogo vranica. Tudi v vranici fagocitirajo ostarele eritrocite makrofagi retikuloendotelijskega sistema. V makrofagu eritrocit razpade in sprosti se hemoglobin, ki razpade na hem in globin. Razgradnja globina poteka proteolitično in se razgradi do aminokislin [7]. Pri razgradnji hema se protoporfirinski obroč najprej odpre in nato reducira v žolčno barvilo bilirubin. Pri

tem se sprosti železo, ki se uskladišči v feritinu, in se ponovno uporabi za sintezo hemoglobina. Bilirubin nato prehaja v kri, kjer se veže na plazemske albumine (nekonjugirani ali indirektni bilirubin), ki ga prenesejo v jetra. Tam se konjugira z glukuronsko kislino in postane vodotopen (konjugirani ali direktni bilirubin). Slednjega jetrne celice izločijo v žolč in od tam vstopa v črevo, kjer ga bakterije reducirajo v urobilinogen. Večji del urobilinogena se izloči z blatom, del pa se resorbira in znova izloči v žolč [8].

1.3 Krvavitve iz prebavil

Krvavitve iz prebavil so pogost zaplet bolezni prebavil in lahko potekajo brez drugih jasnih znakov. Krvavitve prebavil so lahko akutne ali kronične, prikrita ali obilne. Krvavitev se klinično kaže kot melena, hemohezija ali hematohezija ter hemobilija [9].

Pri *meleni* je blato mazavo in črno, kar je posledica bakterijske razgradnje krvi. Črno barvo dajejo sulfurirani razpadni produkti hemoglobina in porfirinski produkti. Melena je pozni znak še potekajoče ali že končane krvavitve. Z imunokemijsko kvantitativno metodo lahko prisotnost krvi v blatu dokažemo še takrat, ko je blato že normalnega videza. Nastane že ob enkratni izgubi 60 do 100 mL krvi. Vir krvavitve je lahko v zgornjem delu gastrointestinalnega trakta, tankem črevesu ali desnem delu debelega črevesa. Značilno smrdeče, črno, mazavo blato, že na oko lahko ločimo od psevdomelene, prav tako črnega blata, ki ga povzročajo nekatera zdravila in hrana, kot so železovi preparati, oglje in nekateri antacidi. Pri *hemoheziji* ali *hematoheziji* gre za odvajanje svetle krvi, pomešane z blatom, ali same rdeče krvi in označuje krvavitev od sredine prečnega dela kolona do analne odprtine. *Hemobilija* je krvavitev iz žolčnih vodov, ki se klinično lahko pokaže kot hematemeza ali melena [9].

Najpogostejši vzroki krvavitev iz spodnjega dela prebavil so hemoroidi, peptične razjede, gastritis, polipi ali črevesni tumorji. Najpogostejši polipi v debelem črevesu so adenomi. Adenomi so prekancerozne lezije, iz katerih se lahko razvije rak debelega črevesa in danke. V debelem črevesu in danki lahko zrastejo kot solitarni ali multipli polipi ali pa nastajajo v sklopu familiarne adenomatozne polipoze. Adenomi so različne velikosti, od nekaj milimetrov do nekaj centimetrov in so običajno asimptomatski, le redko zakrvavijo. Približno 20 % jih prikrito krvavi in daje pozitiven rezultat pri imunokemijski metodi določanja okultne krvi v blatu. Krvavitve povzročajo navadno večji, več kot 2 cm veliki adenomi, ki imajo na površini ulceracijo. O polipozi govorimo takrat, kadar v debelem

črevesu ugotovimo več kot 100 polipov. Večina polipov je dednih in pri večini so izolirani geni, ki so odgovorni za nastanek polipoznega sindroma. Najpogostejši polipozni sindrom je familiarna adenomatozna polipoza. Adenomi familiarne adenomatozne polipoze v 100 % maligno alterirajo. Zaradi raka debelega črevesa in danke umirajo nezdravljeni bolniki najpogosteje okrog 40. leta starosti [9].

Znak kronične krvavitve iz prebavil je največkrat anemija, ki nastane zaradi pomanjkanja železa. Anemija zaradi pomanjkanja železa pri moških in ženskah, starejših od 50 let, je najverjetneje posledica krvavitve iz prebavil (običajno prikrita). Zato je treba določiti prisotnost krvi v blatu [9].

1.4 Rak debelega črevesa in danke

1.4.1 Epidemiologija

Rak na debelem črevesu in danki je resen javno zdravstveni problem v Sloveniji in drugod v razvitem svetu. Gre za potuhnjeno bolezen, ki se lahko v telesu razvija več let brez kakršnih koli očitnih znakov. Po podatkih Registra raka je bil leta 2009 rak na debelem črevesu in danki s 1569 primeri po številu na novo obolelih drugi najpogostejši rak v Sloveniji. 790 ljudi pa je zaradi te bolezni umrlo predvsem zato, ker je bila bolezen odkrita prepozno za učinkovito zdravljenje. V zadnjih 20 letih se brez presejalnega programa odkriva ta rak v zgodnji fazi razvoja le v 12 do 14 %. Preglednici I in II prikazujeta pojavnost, umrljivost, razširjenost in eno-letno preživetje za rakom na debelem črevesu in rakom na danki za leto 2009. Preglednica prikazuje večjo verjetnost, da za rakom na debelem črevesu in danki zbolijo moški. V letu 2009 je bilo takšnih primerov 521 za raka na debelem črevesu in 413 za raka na danki. Tudi smrtnost je pogostejša pri moških kot pri ženskah. Eno-letno preživetje je največje pri ženskah, ki zbolijo za rakom na danki in znaša 78,7 %. Ob teh dejstvih je pomembno vedenje, da je raka na debelem črevesu in danki mogoče uspešno ozdraviti – če ga odkrijemo pravočasno, na zgodnji stopnji razvoja. Ne le to: to vrsto raka je mogoče celo preprečiti, če odkrijemo in odstranimo že predrakave spremembe na sluznici debelega črevesa in danke – polipe [10]. V preglednici I in II so pojavnost, umrljivost in razširjenost izraženi z absolutnim številom, eno-letno preživetje pa predstavlja delež bolnikov, ki so po izbranem obdobju od postavitve diagnoze še živi [11].

Preglednica I: Podatki o raku na debelem črevesu za leto 2009 v Sloveniji [11]

	MOŠKI	ŽENSKE
pojavnost	520	391
umrljivost	289	188
razširjenost	2468	2306
eno-letno preživetje [%]	69	72,1

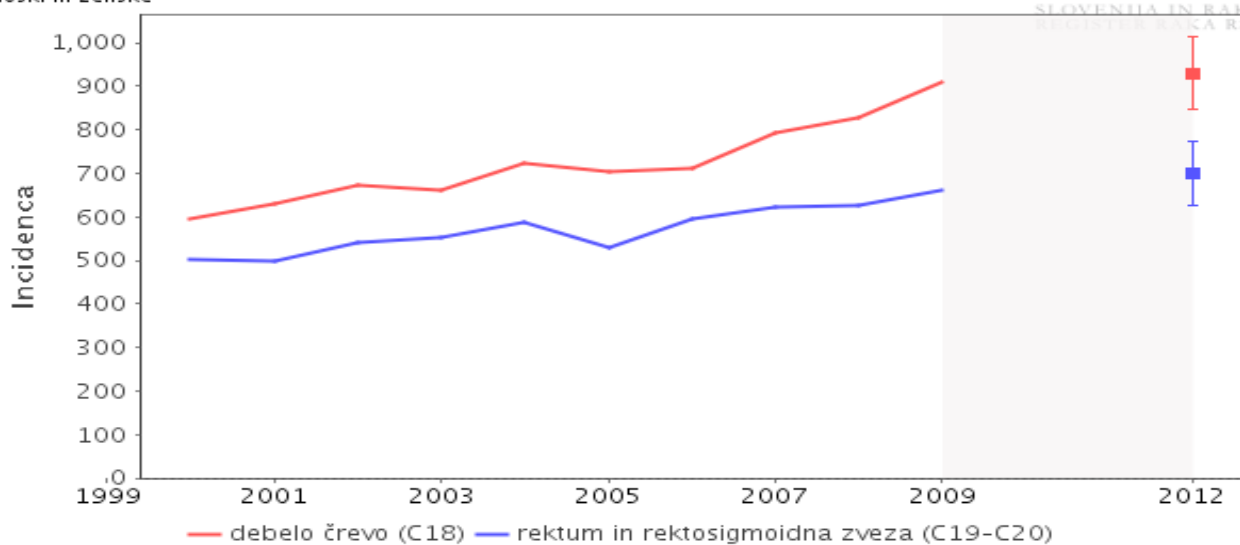
Preglednica II: Podatki o raku na danki za leto 2009 v Sloveniji [11]

	MOŠKI	ŽENSKE
pojavnost	417	248
umrljivost	187	127
razširjenost	2146	1663
eno-letno preživetje [%]	74,3	78,7

Sliki 1 in 2 prikazujeta pojavnost in umrljivost raka na debelem črevesu in danki v Sloveniji. Slika 1 vsebuje podatke od leta 2001 z oceno pojavnosti za leto 2012. Za leto 2012 je ocenjena pojavnost raka na debelem črevesu 929,5 in raka danke 700,4. Slika 2 nam prikazuje podatke od leta 1985 do leta 2009. V zadnjih letih umrljivost zaradi raka na debelem črevesu strmo narašča [11].

Incidenca

debelo črevo (C18), rektum in rektosigmoidna zveza (C19-C20)
Incidenca
moški in ženske

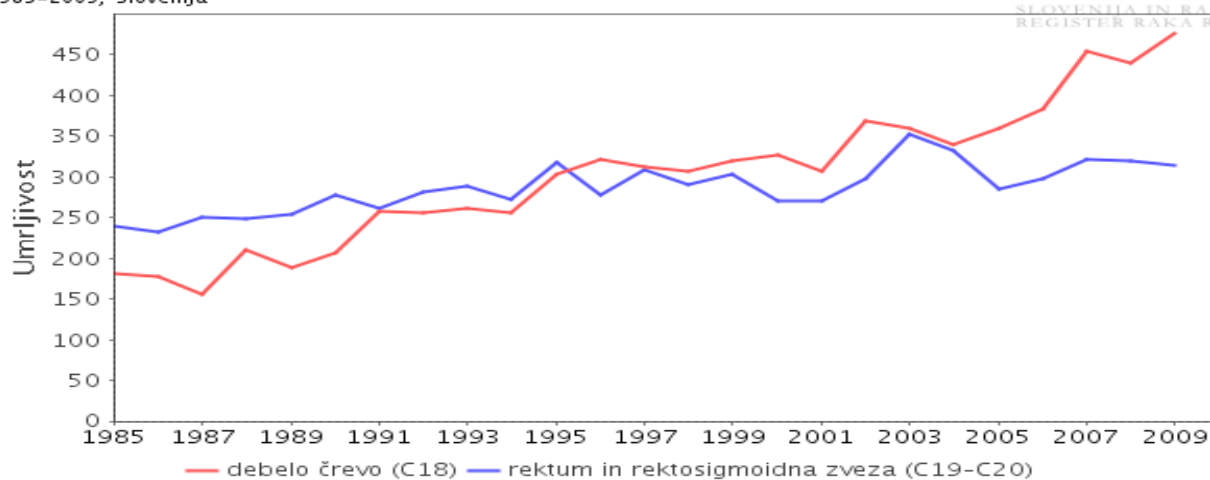


Onkološki inštitut Ljubljana, Register raka RS, 06.05.2013

Slika 1: Pojavnost raka debelega črevesa in danke v Sloveniji [11]

Umrljivost

debelo črevo (C18), rektum in rektosigmoidna zveza (C19-C20)
moški in ženske
1985–2009, Slovenija



Inštitut za varovanje zdravja RS, Register raka RS, 14.05.2013

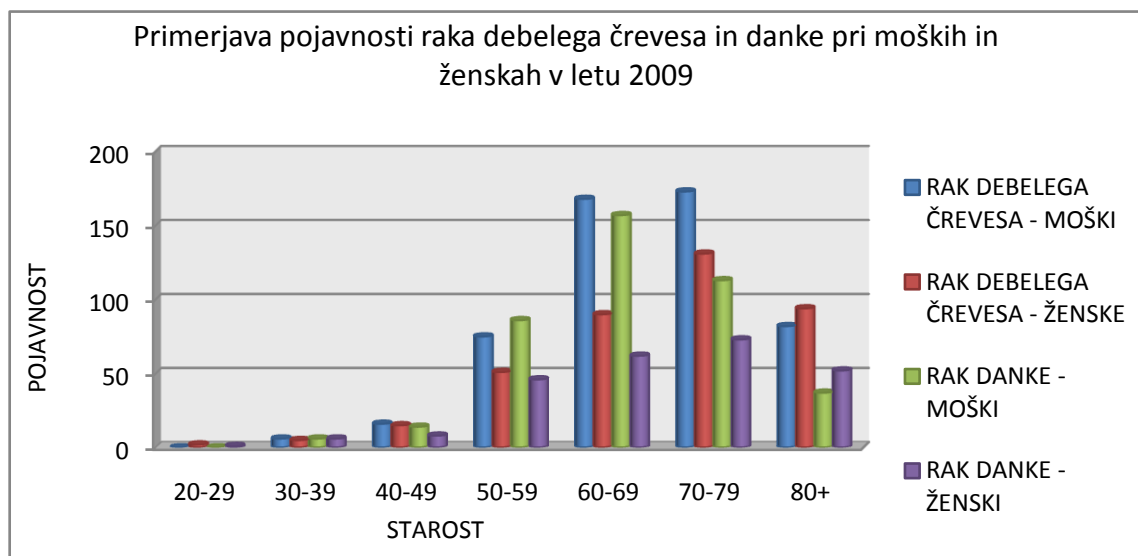
Slika 2: Umrljivost zaradi raka na debelem črevesu in danki v Sloveniji [11]

1.4.2 Kaj je rak debelega črevesa in danke?

Rak debelega črevesa in danke je bolezen z visoko obolevnostjo in umrljivostjo, kar predstavlja velik in resen javno zdravstveni problem. Okoli 90 % bolnikov z rakom na debelem črevesu in danki zboli po 50. letu starosti, bolezen pa se lahko pojavi že prej. Klinični znaki, ki opozarjajo na raka debelega črevesa in danke, so neznaki. Odvisni so od mesta tumorja, njegove velikosti, razširjenosti in zapletov, ki jih tumor povzroča. Med najpogostejše znake sodijo bolečine v trebuhu, sprememba ritma odvajanja blata (pogostost odvajanja, konsistenca blata), krvavitev iz črevesa, slabokrvnost, nenamenska izguba telesne teže, utrujenost. Znano je tudi, da se v 90 % primerov rak debelega črevesa in danke razvije iz prej nastalih adenomatoznih polipov, ki jih lahko z endoskopskimi tehnikami odkrijemo in odstranimo. Žal številni bolniki nimajo nikakršnih težav, saj se rak debelega črevesa in danke razvija počasi in pred pojavom simptomov večinoma mine nekaj let, zato bolezen odkrijemo šele, ko je že v napredovali razvojni stopnji. Rak debelega črevesa in danke je ozdravljiv, če ga odkrijemo dovolj zgodaj, ko se še ni razširil iz črevesa v bezgavke ali drugam po telesu. Posledice bolezni, odkrite v napredovalem stadiju, so visoki stroški zdravljenja, slabše preživetje in visoka stopnja umrljivosti [12].

Slika 3 nam prikazuje primerjavo pojavnosti raka debelega črevesa in danke v letu 2009 glede na spol in starost. Obolevnost narašča s starostjo prebivalcev, saj je opazen dvig po

50. letu starosti. Najpogosteje se bolezen pojavi pri moških starih od 60 do 79 let. Prav zaradi teh podatkov je smiselno uvesti presejalne programe [11].



Slika 3: Pojavnost raka debelega črevesa in danke pri moških in ženskah v letu 2009 [11]

1.5 Presejalni program

Pri zdravljenju je najpomembnejši dejavnik zgodnje odkrivanje bolezni. Bolezen lahko odkrijemo zgodaj na dva načina: prvi je, da skrbno spremljamo nastanek in razvoj zgodnjih znakov in simptomov, drugi pa, da poskušamo odkriti bolezen pri asimptomatskih (brez kliničnih znakov in simptomov) posameznikih. Drugi način zahteva, da imamo sredstva oziroma metode, ki so zmožne odkriti potencialne bolnike med navidezno zdravo populacijo, še preden se razvije klinična slika. Iz ekonomskega vidika je smiselno odkriti bolezen, ko je le-ta še ozdravljiva. Pri takšnem načinu je najprimernejša metoda »screening« – presejanje. Presejalna metoda ni diagnostična, ampak je namenjena temu, da se na bolezen posumi, sumljivo osebo pa se najhitreje napoti na diagnostične preglede, ki zatem potrdijo, ali je resnično bolna ali ne. Presejalne preiskave izvajamo pri posameznikih brez simptomov zaradi zgodnjega odkrivanja bolezni, ko je verjetnost za uspešno zdravljenje največja. Lahko pa tudi preprečimo nastanek bolezni, saj imamo možnost odstraniti predrakave spremembe sluznice. Presejalne preiskave morajo biti enostavne, hitre, sprejemljive in poceni. Tarčne osebe pri presejanju za raka debelega črevesa in danke so skupina moških in žensk, starejših od 50 let, in pa mlajši posamezniki, ki spadajo med ogrožene za razvoj raka. Za uspešno ločevanje bolnih od zdravih je potrebno imeti izdelana

ustrezna merila. Takšno merilo so normalne vrednosti. Posebej pomembna je določitev meje med normalnim in abnormalnim. To naj bi bila tako imenovana prazna vrednost ali prag občutljivosti [13, 14].

V Sloveniji se je leta 2008 začel presejalni program za zgodnje odkrivanje predrakavih sprememb ter raka debelega črevesa in danke z imenom Svit. Zajema moške in ženske, stare od 50 do 69 let. Omogoča odkrivanje prikritih krvavitev v blatu. Vsaki dve leti prebivalci te starosti prejmejo komplet za odvzem dveh vzorcev blata za imunokemično določitev človeškega globina. Udeleženci programa s pozitivnim testom na prikrito krvavitev (koncentracija hemoglobina je $\geq 100 \mu\text{g/L}$) so napoteni na presejalno kolonoskopijo, ki omogoča diagnostiko raka na debelem črevesu in danki ter hkratno odstranjevanje adenomov. Osnovna metoda presejanja je imunokemična metoda na prikrito krvavitev v blatu. Imunokemična metoda, ki se uporablja v programu Svit, je visoko specifična za zaznavanje človeškega hemoglobina in krvavitve v predelu debelega črevesa in danke. Pred preiskavo ni potrebna dieta, dovoljeno je uživanje zdravil. Analiza je popolnoma avtomatizirana. Diagnostična specifičnost imunokemične preiskave za odkritje raka debelega črevesa in danke je 95 %, diagnostična občutljivost pa od 70 do 90 %. S presejalno kolonoskopijo, ki jo zagotavlja program Svit, se diagnosticirajo in obenem odstranjujejo (zdravijo) tako predrakaste, kot rakaste spremembe. Z odstranjevanjem polipov se preprečuje razvoj raka v prihodnosti [2].

Primarni cilj presejalnega programa je zmanjšanje umrljivosti zaradi raka na debelem črevesu in danki za 30 % ter z odkrivanjem in odstranjevanjem polipov tudi zmanjšanje obolevnosti zaradi raka na debelem črevesu in danki za 20 % [15]. Sekundarni cilji programa pa so tudi: večji delež bolnikov z rakom odkritih v zgodnji fazi bolezni, zmanjšanje stroškov zdravljenja bolezni, izboljšanje kakovosti življenja ljudi, ki zbolijo za rakom na debelem črevesu in danki, ter zadovoljstvo ljudi zaradi pozitivnih in smiselnih ukrepov za varovanje njihovega zdravja v zdravstvenem sistemu [1].

2. NAMEN DELA

Dokazovanje prikrite krvi v blatu se uporablja kot presejalna preiskava za odkrivanje bolnikov z rakom debelega črevesa in danke. V Sloveniji poteka presejalni program na osnovi imunokemijske kvantitativne metode, pri čemer preiskovanci sami odvzamejo dva vzorca blata v časovnem zamiku 2 do 4 dni, in ju pošljejo po pošti v laboratorij na analizo. Ob tem se postavlja vprašanje zanesljivosti rezultatov pri podaljšanem časovnem zamiku od odvzema vzorca blata do izvedbe preiskave. To vprašanje temelji na dejstvu, da se pri presejalnih programih okultnih krvavitev v blatu ne sme spregledati, oziroma, da moramo dobiti čim manjše število lažno negativnih rezultatov. Le tako doseže raziskovanje okultne krvi v blatu svoj temeljni namen. Eden od dejavnikov povečanja verodostojnosti raziskave je zagotovo pufer, ki ga pri raziskovanju uporabimo.

Namen našega dela bo zato primerjava dveh izvedb imunokemijske metode, ki temeljita na uporabi dveh različnih pufrov. Njuno kvaliteto bomo primerjali z vidika spreminjanja koncentracije hemoglobina v vzorcih blata pri podaljšanem shranjevanju pred analizo v laboratoriju.

V pufru se hemoglobin ekstahira iz blata, zato menimo, da bo različna sestava pufrov vplivala na spreminjanje koncentracije hemoglobina v vzorcih blata, merjene s časom. Pri tem predvidevamo, da bodo koncentracije hemoglobina v vzorcu blata v novi sestavi pufra bolj stabilne. To pomeni, da bo sama sprememba koncentracije hemoglobina pri novi sestavi pufra s časom manjša kot pri stari sestavi pufra, ki se že uporablja v slovenskem javnem zdravstvenem sistemu. Pri tem natančna sestava pufra sodi v poslovno skrivnost podjetja Eiken, zato bomo, za potrebe naše raziskave, pufer s starejšo sestavo poimenovali z A in pufer z novejšo sestavo z B. Vse meritve bomo izvajali pri sobni temperaturi in pri prazni vrednosti hemoglobina 50 µg/L pufra.

3. MATERIALI IN METODE

Dokazovanje okultne krvi v blatu je laboratorijska preiskava, ki se uporablja za odkrivanje raka na debelem črevesu in danki.

3.1 Vzorci

V obdobju od 11.9.2012 do 22.1.2013 smo zbrali 758 vzorcev blata od pacientov, ki so bili hospitalizirani na različnih oddelkih ali pregledani v različnih ambulantah Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani ter poslani na preiskavo okultne krvi v blatu v Laboratorij za analitiko specialnih telesnih tekočin Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo, Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Vsi vzorci blata so bili do analize v plastičnih posodicah z žličko zaščiteni pred svetlobo in shranjeni v hladilniku. Vsak vzorec, ki je bil oddan v laboratorij, smo testirali v dveh različnih pufrih. Nato smo vzorce blata s koncentracijo hemoglobina $\geq 50 \mu\text{g/L}$ pufra shranili pri sobni temperaturi.

Meritev vzorca mora biti ponovljiva, zato je pomembna njegova kakovost. Pomemben dejavnik pri tem je stabilnost hemoglobina v blatu in v pufru. Globin je protein, ki je dovzeten za denaturacijo, zato smo bili še posebej pazljivi pri shranjevanju, zbiranju in vzorčenju blata.

3.2 Materiali in oprema

3.2.1 Reagenti

Za dokazovanje okultne krvi v blatu smo uporabili imunokemijski kvantitativni analizni komplet OC – Sensor Micro, podjetja Eiken Chemical, Japonska, ki vsebuje:

- OC – AUTO lateks reagent 2 x 7 mL z 1,4 mL suspenzije delcev lateksa, ki so obloženi z zajčjimi imunoglobulini razreda G proti človeškemu hemoglobinu A₀, kat. št.: V-PH33
- OC – AUTO pufer vsebuje 2,38 g N-2-hidroksietilpiperazin-N'-2-etansulfonsko kislino (razredčena raztopina HEPES), kat. št.: V-PH46

- OC – Standard predstavlja standard pri merjenju hemoglobina v blatu, 10 x 1 mL, kat. št.: V-IK50
- Standardni razredčeni pufer “Eiken” – amonijev pufer
- Nizka in visoka kontrola vsebujeta hemolizirano človeško kri, OC-L, 5 x 1 mL, kat. št.: V-PH57, OC-H, 5 x 1 mL, kat. št.: V-PH58
- Redestilirana voda (Lekarna UKC Ljubljana)
- 0,15 % raztopina natrijevega hipoklorita
- Epruvete za vzorčenje: OC – AUTO SEMPLING BOTTLE, kat. št.: V-PZ26 [16]

Reagente smo shranjevali v hladilniku pri temperaturi 2 do 10 °C. Pred uporabo smo jih segreli na sobno temperaturo in šele nato vstavili v analizator. Lateks reagent je lahko kontaminiran z mikroorganizmi, zato smo pri delu z njim ravnali pazljivo in uporabljali zaščitne rokavice. OC – Standard vsebuje človeški hemoglobin A₀, ki je pridobljen iz človeške krvi. Vsak vzorec krvi je testiran na virus HIV in virus hepatitis B, ne pa tudi na virus hepatitisa C. Ker je verjetnost, da so prisotni v reagentu tudi ti patogeni mikroorganizmi, smo pri rokovanju z njim bili pazljivi in uporabljali zaščitna sredstva [16].

3.2.2 Oprema

Pri delu smo uporabljali naslednjo opremo, ki je prikazana na sliki 4 in 5:

- Biokemični analizator (OC – Sensor Micro, Eiken Chemical, Tokio, Japonska)
- Centrifuga (Tehnica PLC 322, Železniki, Slovenija)
- Avtomatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija), 100 – 1000 µL



Slika 4: Centrifuga



Slika 5: Biokemični analizator

3.2.3 Biokemični analizator

Pripravljene vzorce blata smo analizirali na avtomatiziranem biokemičnem analizatorju OC – Sensor Micro, podjetja Eiken Chemical, Japonska. Analizni komplet OC – Sensor Micro vsebuje steklenice za pufer, čistilno tekočino z 0,15 % natrijevega hipoklorita in redestilirano vodo. V analizator je potrebno vstaviti epruvete z vzorci na posebnem stojalu in kivete, kjer potekajo reakcije, termostatisirane na 37 °C. Pri tem se izmeri 35 μ L vzorca. Na koncu meritev nam analizator natisne rezultate v μ g/L pufru. Linearno območje analizatorja je od 50 – 1000 μ g/L, kar je ekvivalentno 10 – 200 μ g hemoglobina/g blata (enačba 1). Analizatorju so priložene testne epruvete, ki vsebujejo 2 mL pufru za stabilizacijo hemoglobina. Testna epruveta ima zeleni zamašek, na katerega je pritrjena paličica, ki ima na konici zareze, v katere se ujame blato. Epruvete vsebujejo filter sistem, ki odstrani večje delce blata, ki bi motile analizo. V pufru se ekstrahira samo 10 mg blata, ki prehaja filter s konico palčke. Vsaka epruveta ima na zunanji strani črtno kodo in prostor

za ime pacienta in datum odvzema vzorca. Analizator predre membrano epruvete in v kiveto odpipetira 25 µL vzorčne raztopine, 60 µL lateksnega reagenta ter 300 µL raztopine pufra HEPES (N-2-hidroksietilpiperazin-N'-2-etansulfonska kislina). Po končanem vzorčenju analizator pipeto očisti z redestilirano vodo. Po vsakem ciklu pa se sistem prečisti še z 0,15 % natrijevim hipokloritom. Celoten cikel merjenja traja približno 10 minut in v eni uri lahko analizator izmeri koncentracije hemoglobina 50 vzorcem [17,18,19,20,21]. Naslednja enačba pretvori prisotno koncentracijo hemoglobina v vzorcu blata (µg/g blata) v sistem pufra (µg/L) [22]:

$$\mu\text{g/L} = \frac{\frac{\text{mg Hb}}{\text{g blata}} \times \text{dodana masa blata v vzorcu (mg)} \times 1000}{\text{volumen pufra v epruveti (mL)}} \quad (\text{enačba 1})$$

3.3 Eksperimentalno delo

Za izvedbo metode potrebujemo kalibrator, kontrole in reagente.

3.3.1 Kalibracija

Pri kalibraciji analizator razredči lateksov reagent hemoglobin A_0 in izmeri šest točk ter izriše kalibracijsko krivuljo, ki jo potrdimo v primeru, če so izmerjene vrednosti v okviru $\pm 10\%$ glede na teoretično vrednost. Vrednosti kalibracijske krivulje prikazuje preglednica III.

Preglednica III: Vrednosti kalibracijske krivulje

Teoretična vrednost [µg/L]	10 % interval teoretičnih vrednosti [µg/L]
0	0
60	54 – 66
120	108 – 132
240	216 – 264
480	432 – 528
960	864 – 1056

Postopek: Po vstavitvi nove serije lateksnega reagenta ali vsakih 14 dni ali, če izmerjene vrednosti kontrol niso bile v predpisanem intervalu, smo izvedli kalibracijsko krivuljo. Pazili smo, da smo v analizator vstavili reagente, ki so bili ogreti na sobno temperaturo.

Liofiliziran kalibracijski material, ki vsebuje človeški hemoglobin, smo raztopili v 1 mL redestilirane vode. Nato smo v nosilec kivet vstavili kiveto s kalibratorjem, 2 mL amonijevega pufra, 6 praznih kivet ter 200 μ L vzorca nizke in visoke kontrole. Če so bile izmerjene vrednosti v okviru teoretičnih, smo kalibracijsko krivuljo potrdili.

3.3.2 Analiza kontrolnega materiala

Pred vsako meritvijo koncentracije človeškega hemoglobina v vzorcu blata smo opravili analize kontrolnega materiala (hemolizirana človeška kri) dveh različnih koncentracij: nizko kontrolo s koncentracijo hemoglobina 120 – 180 μ g/L in visoko kontrolo s koncentracijo hemoglobina 516 – 774 μ g/L. V liofilizirane kontrolne vzorce smo odpipetirali 1 mL redestilirane vode, nato smo vsako kontrolo razdelili po 200 μ L v 5 kivet in jih zamrznili pri -20°C . Pred vsako analizo smo odmrznili kontrolna vzorca obeh koncentracij ter ju analizirali na analizatorju. Če so bili rezultati analize obeh kontrolnih vzorcev znotraj predpisanega intervala, je pomenilo, da so rezultati zanesljivi in smo lahko nadaljevali z analizo vzorcev.



Slika 6: Priprava vzorcev iz ekstrakta blata

3.3.3 Analiza vzorcev

Priprava ekstrakta vzorca blata: Za vsak vzorec blata smo si pripravili epruveto s pufrom A in pufrom B, ki smo ju označili. Blato smo odvzeli s pomočjo aplikatorja na petih različnih delih vzorca blata, najprej v epruveto s pufrom A in nato še v epruveto s pufrom B. Pufer A in pufer B smo vzorčili na istih mestih blata. Po dodatku blata smo epruveto premešali. Vzorce smo pustili stati na sobni temperaturi dve uri. Pred analizo smo vzorec ponovno premešali in pazili, da niso nastali mehurčki. Analizo smo izvedli na OC – Sensor Micro. Najprej smo analizirali vse vzorce v epruvetah s pufrom A, v drugi seriji še vzorce v epruvetah s pufrom B. Vzorce s koncentracijo hemoglobina $< 50 \mu\text{g/L}$ pufra smo zavrgli. Vzorce s koncentracijo hemoglobina $\geq 50 \mu\text{g/L}$ pufra pa smo iz testnih epruvet prenesli v plastične epruvete, ki jih prikazuje slika 6, jih zatesnili s parafilmom in pustili pri sobni temperaturi. Po 14 in 28 dneh smo vzorce centrifugirali 1 min z relativno centrifugalno silo 140 g ter nato 200 μL supernatanta ponovno analizirali.

4. REZULTATI in RAZPRAVA

Priporočen čas od odvzema vzorcev blata do analize v laboratoriju je 1 teden. Ker je možnost, da pride s časom do termodinamsko pogojene reakcije razpada hemoglobina, bi s podaljšanjem časa in pri temperaturi 25 °C, bil ta razpad obsežnejši in bi morebitne razlike med pufroma prišle bolj do izraza. Zato smo se odločili, da bomo primerjali rezultate meritve v pufru A in B takoj ob odvzemu vzorca (čas 0) ter nato po 14 in 28 dneh ob shranjevanju vzorcev na sobni temperaturi (25 °C).

S statističnimi orodji smo primerjali lastnosti dveh populacij (srednje vrednosti, standardni odklon in koeficient variacije) ter s parametričnimi testi ovrednotili hipoteze statističnih spremenljivk (parni t test za odvisna vzorca, Pearsonov korelacijski koeficient). Ker pa porazdelitev rezultatov v času 0, po 14 in 28 dneh v vseh primerih ni normalna, smo uporabili še neparametrična orodja (Spearmanov korelacijski koeficient, konstingenčni koeficient).

Imunokemijska kvantitativna metoda je uveljavljena v diagnostični praksi in stalno nadzirana preko predpisanih zunanjih in notranjih kontrol. Ponovljivost metode smo opredelili s koeficientom variacije, ki je v času naše študije pri $n = 70$ (2×35) znašala 7,3 %.

4.1 PRIMERJAVA KONCENTRACIJ HEMOGLOBINA V PUFRU A IN B V ČASU 0

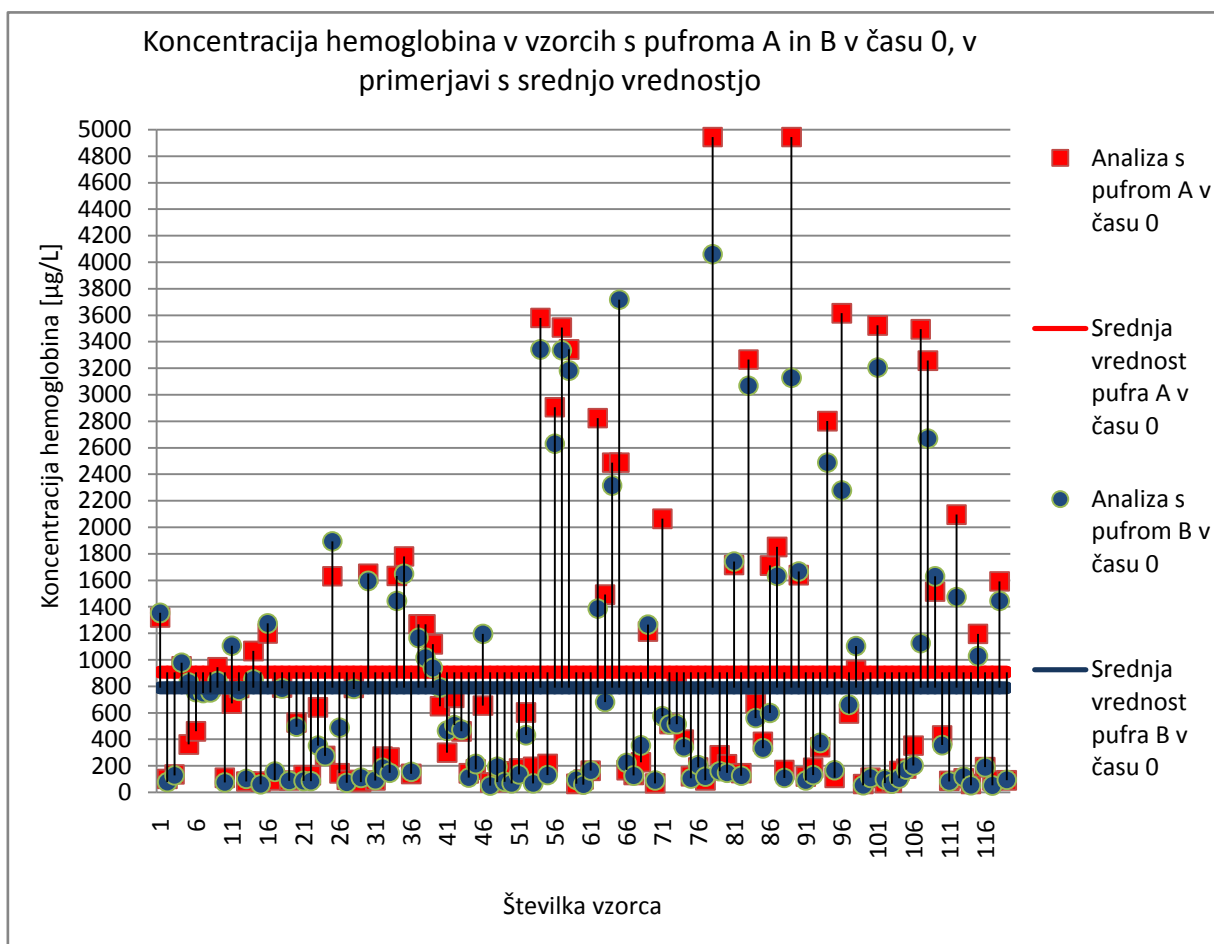
Ob primerjavi rezultatov koncentracije hemoglobina v vzorcih blata s pufrom A in pufrom B v času 0 smo ugotovili, da je minimalna koncentracija hemoglobina v istem vzorcu blata izmerjena s pufrom A 64 µg/L pufra ter s pufrom B 52 µg/L pufra. Ko smo izvedli metodo s pufrom A, smo izmerili maksimalno vrednost hemoglobina v vzorcu blata, ki je znašala 4944 µg/L pufra. V primeru izvedbe metode s pufrom B pa smo pri istem vzorcu dobili maksimalno vrednost 4060 µg/L pufra (preglednica IV). Če primerjamo srednje vrednosti med pufroma A in B ugotovimo, da imajo meritve s pufrom A večje vrednosti (srednja vrednost s pufrom A je $906,61 \mu\text{g/L} \pm 202,37 \mu\text{g/L}$) kot meritve s pufrom B (srednja

vrednost s pufrom B je $790,39 \mu\text{g/L} \pm 170,57 \mu\text{g/L}$). Razlika srednjih vrednosti med pufrom A in B znaša 14,7 %.

Preglednica IV: Rezultati meritev imunokemijske metode s pufrom A in B v času 0

Št. vzorca	Pufer A [$\mu\text{g/L}$]	Pufer B [$\mu\text{g/L}$]	Št. vzorca	Pufer A [$\mu\text{g/L}$]	Pufer B [$\mu\text{g/L}$]	Št. vzorca	Pufer A [$\mu\text{g/L}$]	Pufer B [$\mu\text{g/L}$]
1	1319	1355	41	300	466	81	1715	1743
2	103	79	42	713	508	82	146	126
3	137	129	43	461	473	83	3266	3068
4	953	979	44	145	112	84	672	562
5	362	830	45	174	215	85	383	333
6	461	758	46	655	1197	86	1712	600
7	798	750	47	76	54	87	1852	1634
8	802	754	48	79	194	88	170	110
9	944	841	49	101	81	89	4944	3129
10	111	76	50	159	68	90	1640	1667
11	671	1107	51	183	137	91	121	90
12	790	766	52	604	432	92	186	131
13	84	102	53	193	69	93	342	374
14	1067	853	54	3580	3342	94	2801	2489
15	82	62	55	216	131	95	111	168
16	1200	1275	56	2906	2631	96	3615	2278
17	92	157	57	3507	3336	97	596	662
18	792	78	58	3342	3183	98	924	1105
19	90	88	59	65	95	99	64	52
20	528	496	60	98	59	100	111	111
21	130	87	61	164	166	101	3523	3205
22	129	85	62	2825	1387	102	72	99
23	642	353	63	1492	682	103	75	67
24	276	275	64	2489	2316	104	162	106
25	1631	1895	65	2489	3717	105	180	172
26	145	489	66	169	224	106	354	204
27	96	74	67	131	128	107	3494	1126
28	789	781	68	228	355	108	3258	2669
29	78	111	69	1215	1267	109	1515	1630
30	1649	596	70	69	91	110	430	357
31	90	94	71	2065	575	111	88	84
32	272	187	72	517	513	112	2096	1474
33	265	148	73	843	515	113	108	118
34	1633	1446	74	400	342	114	64	54
35	1781	1649	75	123	106	115	1197	1029
36	140	156	76	190	207	116	191	191
37	1269	1166	77	92	120	117	90	53
38	1268	1017	78	4944	4060	118	1592	1446
39	1118	939	79	281	160	119	92	95
40	651	793	80	214	149			

Rezultate meritev, dobljene s pufroma A in B, smo predstavili tudi grafično, in ju primerjali s srednjima vrednostima (slika 7). Vrednosti posameznih vzorcev, dobljenih s pufroma A in B, se pod srednjima vrednostima prekrivajo, pri večjih vrednostih koncentracije hemoglobina pa lahko opazimo večja odstopanja. Ugotovili smo tudi, da ne glede na uporabo vrste pufru dobimo 39 meritev, ki so nad srednjo vrednostjo. Pri tem gre pri 35 meritvah za isti vzorec, ekstrahiran najprej v pufru A in nato v pufru B.



Slika 7: Koncentracija hemoglobina v vzorcih s pufroma A in B v času 0

4.1.1 Primerjava srednjih vrednosti, dobljenih s pufrom A in B v času 0

Za primerjavo rezultatov, dobljenih s pufrom A in B, smo uporabili parametrični parni t test za odvisne vzorce. Primerjali smo mediane skupin rezultatov ($n = 119$) in ugotovili, da je vrednost testne statistike $T = 3,034$ in presega kritično vrednost, ki znaša $t_{0,05} = 1,97$. Izračunana signifikanca je manjša od $\alpha = 0,05$, zato lahko povzamemo, da se srednji

vrednosti meritev, dobljenih s pufrom A in B v času 0, statistično razlikujeta (preglednica V).

Preglednica V: Primerjava statističnih rezultatov glede na pufer A in B v času 0

T vrednost	3,034
d.f. (stopinje prostosti)	118
P vrednost	0,03

P vrednost testa je signifikanca ali stopnja značilnosti in znaša 0,03 ter je manjša od 0,05, kar pomeni, da so razlike statistično značilne. Zato zavrnilo ničelno hipotezo, ki predpostavlja, da je pri uporabi pufra A in B povezanost spremenljivk statistično značilna, ter sprejmemo alternativno hipotezo, ki pravi, da so različno izmerjene koncentracije hemoglobina v blatu med pufrom A in B posledica različne sestave pufra.

4.1.2 Ujemanje rezultatov med pufrom A in B v času 0

Medsebojno zvezo med rezultati meritev s pufrom A in B smo preučili z metodo korelacije. Na ta način smo poskušali ugotoviti odnos med rezultati in možno medsebojno povezanostjo oziroma ujemanjem. Glede na izračunane parametre iz preglednice VI ugotovimo, da so rezultati meritev pridobljeni s pufrom A in B povezani med seboj, saj je vrednost kontingenčnega koeficienta 0,799, vrednost Spearmanove korelacije 0,941 ter Pearsonovega korelacijskega koeficienta 0,931. Pri tem velja, da vrednost +1 pomeni maksimalno pozitivno korelacijo, vrednost -1 pa maksimalno negativno korelacijo in vrednost 0 nakazuje, da med obema spremenljivkama ni nobene povezanosti [23].

Preglednica VI: Statistični parametri primerjave pufra A in B v času 0

STATISTIČNI PARAMETRI	Vrednost	P vrednost
Kontingenčni koeficient	0,799	-0,001
Spearmanov korelacijski koeficient	0,941	-0,001
Pearsonov korelacijski koeficient	0,931	-0,001

Ničelno hipotezo, ki govori o nekolinearnosti rezultatov, zavržemo (signifikanca je -0,001, kar je manj kot 0,05). Iz tega vidimo, da so meritve koncentracij hemoglobina v vzorcih blata s pufrom A in B povezane. Ta povezava je močna in statistično značilna.

Ujemanje rezultatov smo opredelili še s statističnima kazalcema – standardnim odklonom in koeficientom variacije, ki prikazujeta sipanje rezultatov okrog srednje vrednosti, dobljene s pufroma A in B (preglednica VII). Koeficient variacije dobljen pri metodi s pufrom A znaša 122,97 % in pri metodi s pufrom B 118,90 %. Njuna razlika je 3,4 %, kar pomeni, da z obema metoda izmerimo primerljivo sipanje rezultatov okrog srednje vrednosti.

Preglednica VII: Standardni odklon in koeficient variacije pri pufru A in B v času 0

	PUFER A	PUFER B
število vzorcev	119	119
x povprečje	906,61 ± 202,37 µg/L	790,40 ± 170,57 µg/L
standardni odklon [SD]	1114,83 µg/L	939,66 µg/L
koeficient variacije [KV]	122,97 %	118,90 %

4.2 PRIMERJAVA KONCENTRACIJ HEMOGLOBINA V PUFRU A IN B PO 14 IN 28 DNEH

Pripravljene vzorce blata v pufru A in B, ki so po prvem merjenju imeli koncentracijo hemoglobina ≥ 50 µg/L, smo shranili pri sobni temperaturi, in jim po 14 in 28 dneh ponovno izmerili koncentracijo. Ugotovili smo, da je minimalna vrednost dosežena pri pufru A, in znaša 9 µg/L po 14 dneh in 16 µg/L po 28 dneh. Minimalne vrednosti pri pufru B so 18 µg/L po 14 dneh in 43 µg/L po 28 dneh merjenja. Maksimalne vrednosti koncentracije hemoglobina so pri metodi s pufrom A večje kot pri pufru B, in sicer po 14 dneh je maksimalna vrednost 5609 µg/L in po 28 dneh 6245 µg/L. Pri pufru B so maksimalne koncentracije hemoglobina 5263 µg/L po 14 dneh in 4811 µg/L po 28 dneh (preglednica VIII in XI).

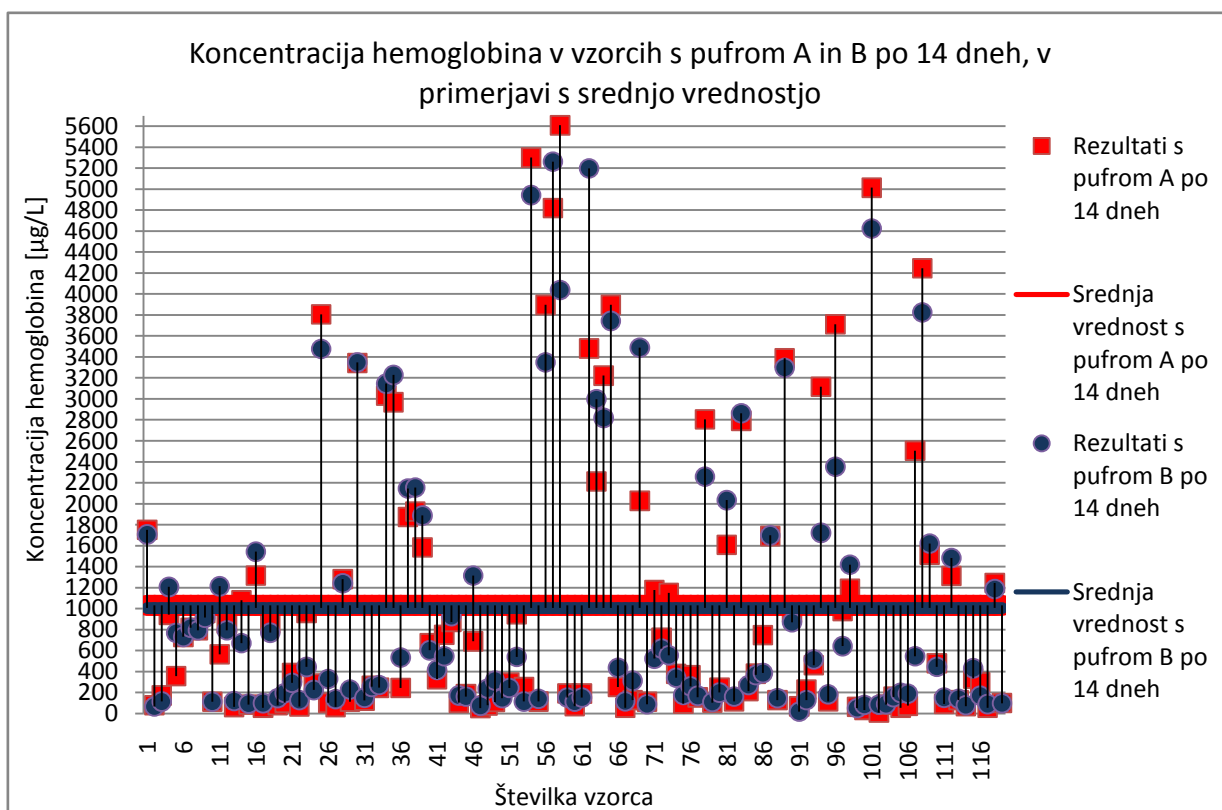
Preglednica VIII: Rezultati meritev imunokemijske metode s pufrom A in B po 14 dneh

Št. vzorca	PUFER A [µg/L]	PUFER B [µg/L]	Št. vzorca	PUFER A [µg/L]	PUFER B [µg/L]	Št. vzorca	PUFER A [µg/L]	PUFER B [µg/L]
1	1752	1707	41	327	416	81	1609	2034
2	79	66	42	750	546	82	116	161
3	172	114	43	872	929	83	2791	2862
4	941	1207	44	101	172	84	213	562
5	356	769	45	184	161	85	379	367
6	730	730	46	688	1314	86	748	385
7	817	818	47	51	74	87	1692	1698
8	792	793	48	77	237	88	128	145
9	957	913	49	109	313	89	3388	3296
10	113	111	50	274	145	90	960	869
11	564	1213	51	296	243	91	68	18
12	859	793	52	947	539	92	229	127
13	62	118	53	253	114	93	460	514
14	1078	671	54	5301	4944	94	3116	1723
15	85	94	55	114	139	95	115	182
16	1314	1542	56	3896	3349	96	3712	2353
17	53	98	57	4820	5263	97	978	642
18	857	770	58	5609	4038	98	1188	1418
19	79	146	59	192	152	99	63	51
20	101	195	60	69	112	100	32	82
21	387	292	61	190	152	101	5014	4625
22	66	128	62	3481	5198	102	9	84
23	959	443	63	2212	2997	103	84	89
24	287	223	64	3222	2819	104	160	156
25	3806	3477	65	3896	3744	105	53	196
26	101	329	66	252	435	106	74	189
27	62	137	67	53	115	107	2506	545
28	1282	1241	68	128	312	108	4246	3825
29	112	229	69	2028	3488	109	1513	1621
30	3342	3348	70	112	87	110	479	445
31	123	150	71	1177	523	111	90	150
32	265	254	72	722	618	112	1311	1483
33	245	271	73	1151	555	113	127	139
34	3031	3145	74	377	341	114	69	79
35	2968	3228	75	93	177	115	333	431
36	243	534	76	366	258	116	297	171
37	1873	2146	77	153	168	117	53	89
38	1925	2154	78	2805	2259	118	1245	1186
39	1583	1887	79	102	108	119	100	97
40	670	602	80	246	199			

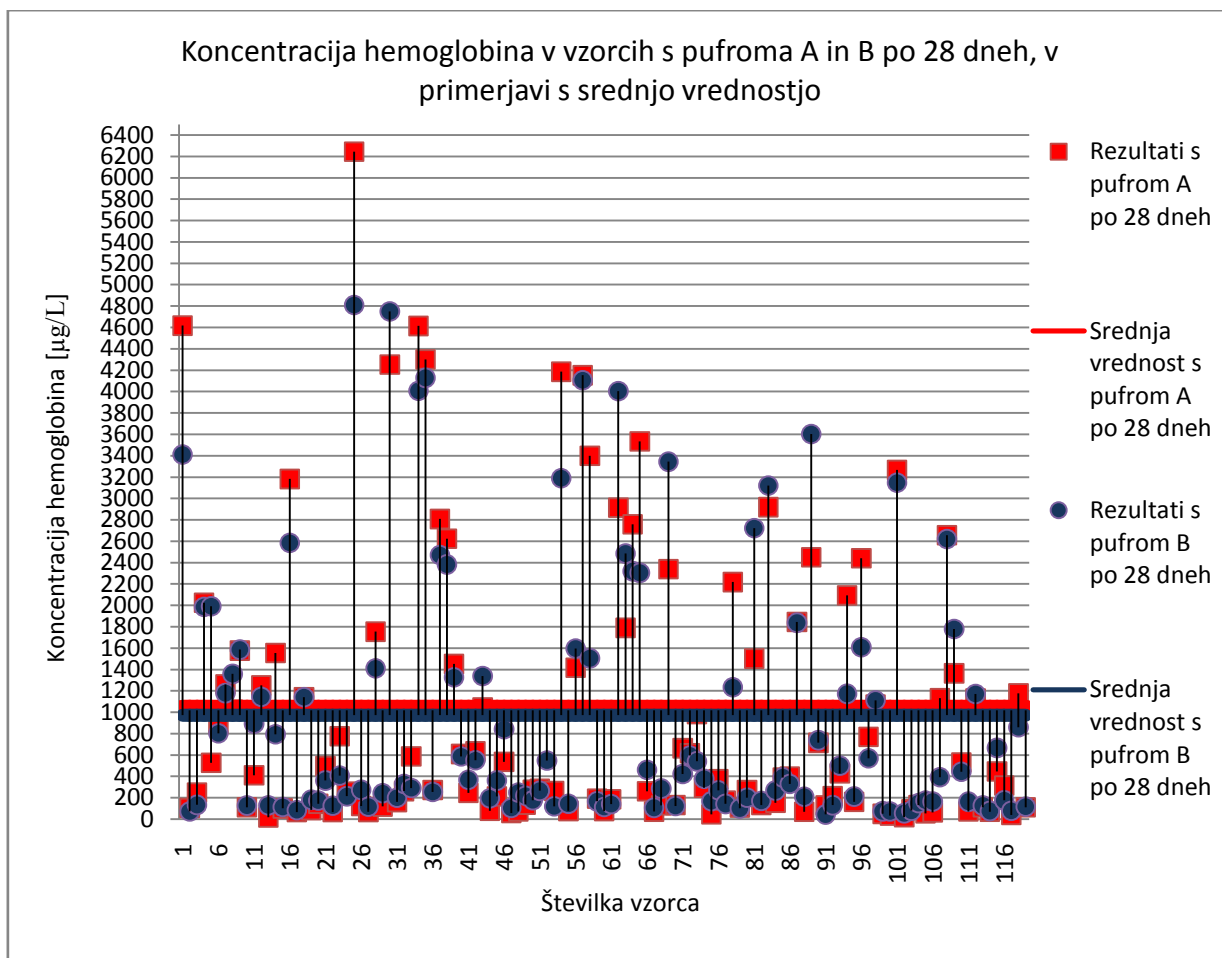
Preglednica IX: Rezultati meritev imunokemijske metode s pufrom A in B po 28 dneh

Št. vzorca	PUFER A [µg/L]	PUFER B [µg/L]	Št. vzorca	PUFER A [µg/L]	PUFER B [µg/L]	Št. vzorca	PUFER A [µg/L]	PUFER B [µg/L]
1	4617	3414	41	246	368	81	1502	2723
2	104	71	42	633	552	82	131	171
3	248	133	43	1046	1339	83	2919	3122
4	2025	1985	44	77	194	84	153	270
5	528	1992	45	213	361	85	388	391
6	889	802	46	537	841	86	398	329
7	1262	1179	47	57	104	87	1845	1838
8	1024	1358	48	71	248	88	69	209
9	1577	1586	49	136	218	89	2451	3603
10	111	127	50	274	177	90	714	738
11	411	892	51	285	265	91	129	43
12	1251	1145	52	1008	549	92	215	130
13	16	129	53	264	119	93	429	500
14	1555	794	54	4186	3190	94	2094	1173
15	100	113	55	76	143	95	162	211
16	3183	2584	56	1417	1596	96	2441	1608
17	65	83	57	4153	4107	97	769	569
18	1140	1142	58	3399	1505	98	1071	1112
19	85	181	59	191	166	99	49	73
20	143	173	60	75	113	100	33	72
21	496	361	61	185	140	101	3266	3149
22	65	125	62	2914	4004	102	18	55
23	775	407	63	1790	2485	103	91	79
24	258	214	64	2759	2320	104	130	150
25	6245	4811	65	3534	2305	105	53	174
26	122	274	66	260	461	106	62	165
27	67	117	67	70	106	107	1132	392
28	1754	1411	68	128	286	108	2656	2621
29	118	242	69	2340	3344	109	1364	1779
30	4254	4751	70	132	122	110	530	444
31	160	201	71	663	422	111	72	163
32	262	329	72	617	597	112	1129	1172
33	587	291	73	984	541	113	111	127
34	4614	4007	74	293	378	114	69	76
35	4302	4129	75	44	168	115	447	666
36	273	254	76	374	269	116	314	175
37	2808	2471	77	174	142	117	39	77
38	2624	2383	78	2218	1234	118	1176	860
39	1451	1326	79	109	100	119	111	116
40	610	587	80	273	200			

Če primerjamo srednje vrednosti meritev po 14 dneh v pufru A (srednja vrednost je $1029,71 \mu\text{g/L} \pm 242,01 \mu\text{g/L}$) in v pufru B (srednja vrednost je $1005,34 \mu\text{g/L} \pm 232,84 \mu\text{g/L}$), ugotovimo, da se srednji vrednosti meritev razlikujeta le za 2,4 %. Po 28 dneh so razlike srednjih vrednostih večje (srednja vrednost v pufru A je $1017,78 \mu\text{g/L} \pm 234,18 \mu\text{g/L}$ in v pufru B $972,05 \mu\text{g/L} \pm 215,25 \mu\text{g/L}$) in znašajo 4,7 % (sliki 8 in 9). Na slikah 8 in 9 lahko vidimo, kako se posamezni vzorci ujemajo glede na uporabo pufru A ali B. Tudi v tem primeru so ujemanja rezultatov vzorcev največja pri koncentracijah hemoglobina, ki so pod srednjo vrednostjo, in večja kot je koncentracija hemoglobina, večja so odstopanja glede na vrsto pufru. Po 14 dneh ponovne analize smo ugotovili, da je 36 vzorcev s pufrom A in 35 vzorcev s pufrom B imelo koncentracijo hemoglobina nad srednjo vrednostjo. Pri tem je 32 istih vzorcev, izmerjenih z obema pufroma. Po 28 dneh ponovne analize pa ugotovimo, da je v primeru pufru A in B prišlo do znižanja srednjih vrednosti in do večjega števila odstopanj nad to vrednostjo, in sicer 41 vzorcev pri uporabi pufru A in 39 vzorcev pri uporabi pufru B. V tem primeru pa je do povečanja koncentracije hemoglobina prišlo pri 35 istih vzorcev, izmerjenih z obema pufroma. Na podlagi tega lahko sklepamo, da je po 28 dneh prišlo še do večjega nihanja rezultatov, in da čas pomembno vpliva na rezultate analize.



Slika 8: Koncentracija hemoglobina v vzorcih s pufroma A in B po 14 dneh



Slika 9: Koncentracija hemoglobina v vzorcih s pufroma A in B po 28 dneh

4.2.1 Primerjava srednjih vrednosti, dobljenih s pufrom A in B po 14 in 28 dneh

Nameravali smo ugotoviti, ali je povezava med srednjimi vrednostmi meritev vzorcev blata, dobljenimi s pufrom A in B, značilna, zato smo izvedli parni t test za odvisna vzorca. Ugotovili smo, da pri stopnji značilnosti $\alpha = 0,05$ ničelno hipotezo, ki pravi, da se srednji vrednosti glede na obe izvedbi metode s pufroma A in B v času 14 dni in 28 dni ne razlikujeta, sprejmemo, saj vidimo, da je vrednost testne statistike $T = 0,627$ po 14 dneh in $T = 1,099$ po 28 dneh od začetka analize, ter ne presegata kritične vrednosti, ki je $t_{0,05} = 1,97$. Prav tako je izračunana signifikanca večja od 0,05, saj dobimo, da je po 14 dneh P vrednost enaka 0,532 ter po 28 dneh je P vrednost 0,274 (preglednica X). Primerjava srednjih vrednosti nam kaže, da se s podaljševanjem časa shranjevanja vzorcev pred analizo, zmanjšuje vpliv sestave pufrja na rezultate merjenja. Razlike med rezultati pa

nastanejo zaradi drugih vzrokov, kot na primer heterogene sestave vzorca blata, konsistence blata, jemanja zdravil, temperature shranjevanja itd.

Preglednica X: Primerjava statističnih rezultatov glede na pufer A in B po 14 in 28 dneh

	T vrednost	d.f. (stopinje prostosti)	P vrednost
pufer A in pufer B po 14 dneh	0,627	118	0,532
pufer A in pufer B po 28 dneh	1,099	118	0,274

Nihanja v koncentraciji hemoglobina so pri uporabi pufera A večja kot pri uporabi pufera B, vendar se razlike s časom manjšajo, in so najmanjše 14. dan merjenja.

4.2.2 Ujemanje rezultatov med pufroma A in B po 14 in 28 dneh

Ujemanje rezultatov, dobljenih s pufrom A in B po 14 in 28 dneh, smo preverili s korelacijskimi koeficienti, ki odgovarjajo na vprašanje, ali obstaja povezanost med rezultati meritev s pufrom A in B, ter kako močna je ta povezanost. Kontingenčni koeficient zavzame vrednosti 0,789 pri merjenju 14. dan ter 0,776 pri merjenju 28. dan. Kadar so vrednosti koeficienta med 0,6 in 1, govorimo o močni povezanosti med rezultati. Spearmanov in Pearsonov koeficient pa kažeta na zelo močno povezanost med rezultati meritev s pufrom A in B po 14. in 28. dnevu. Vrednosti, ki jih zavzamejo, so 0,935 po 14 dneh in 0,933 po 28 dneh merjenja za Spearmanov koeficient ter 0,948 po 14 dneh in 0,936 po 28 dneh merjenja za Pearsonov koeficient (preglednica XI). Ujemanje rezultatov, dobljenih po metodi s pufrom A in pufrom B, je veliko, in na podlagi tega lahko sklepamo, da razlike v koncentraciji hemoglobina po 14 dneh in 28 dneh niso odvisne od pufera, v katerem so vzorci blata ekstrahirani.

Preglednica XI: Statistični parametri primerjave pufera A in B po 14 in 28 dneh

STATISTIČNI PARAMETRI	Vrednost po 14 dneh	Vrednost po 28 dneh
Kontingenčni koeficient	0,789	0,776
Spearmanov korelacijski koeficient	0,935	0,933
Pearsonov korelacijski koeficient	0,948	0,936

Pri primerjavi povezanosti rezultatov, dobljenih s pufroma A in B, in v različnih časovnih intervalih (v času 0, po 14 dneh in 28 dneh) ugotovimo, da se povezanost rezultatov s časom manjša. Po Pearsonovem koeficientu dobimo največjo povezanost 14. dan meritev

($k=0,948$) in najmanjšo povezanost 0. dan merjenja ($k=0,931$). Ti podatki so v skladu s prej omenjenimi srednjimi vrednostmi, in sicer smo največje razlike v srednjih vrednostih med rezultati s pufrom A in B, dobili v času 0, ki so znašale 14,7 %. Najmanjše razlike v srednjih vrednostih pa smo dobili po 14 dneh merjenja, in sicer le 2,7 %. Določali smo tudi koeficient po Spearmanu in kontingenčni koeficient, ki pa nakazujeta največjo povezanost podatkov na začetku analize (kontingenčni koeficient je 0,799 in koeficient po Spearmanu je 0,941), najmanjšo pa 28 dan (kontingenčni koeficient je 0,776 in koeficient po Spearmanu je 0,933).

Sipanje rezultatov pri uporabi pufra A in B smo preverili še s koeficientom variacije (preglednica XII). Največjo homogenost med rezultati, dobljenimi s pufrom A in B, smo ugotovili po 14 dneh merjenja, saj je razlika med koeficientom variacije 1,5 %. Po 28. dnevnu merjenja je razlika v njuni razpršenosti večja in znaša 3,9 % in kaže na večja odstopanja med meritvami.

Preglednica XII: Standardni odklon in koeficient variacije pri pufri A in B po 14 in 28 dneh

	PUFER A		PUFER B	
	14. dan	28. dan	14. dan	28. dan
število vzorcev	119	119	119	119
x povprečje	1029,71 ± 242,01 µg/L	1017,78 ± 234,18 µg/L	1005,34 ± 232,84 µg/L	972,05 ± 215,25 µg/L
standardni odklon [SD]	1333,25 µg/L	1289,86 µg/L	1282,58 µg/L	1185,63 µg/L
koeficient variacije [KV]	129,5 %	126,7 %	127,6 %	122,0 %

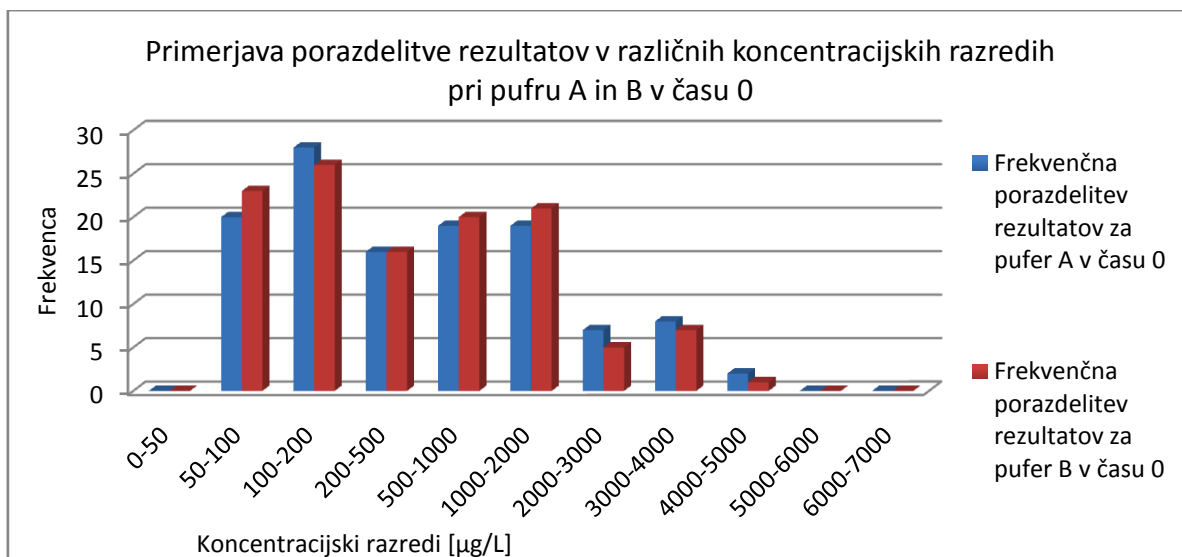
4.2.3 Primerjava pufra A in B glede na koncentracijske intervale

Rezultate meritev s pufrom A in B smo razporedili v enajst frekvenčnih razredov, ki so prikazani v preglednici XIII in slikah 10, 11 in 12.

Preglednica XIII: Razporeditev rezultatov po intervalih

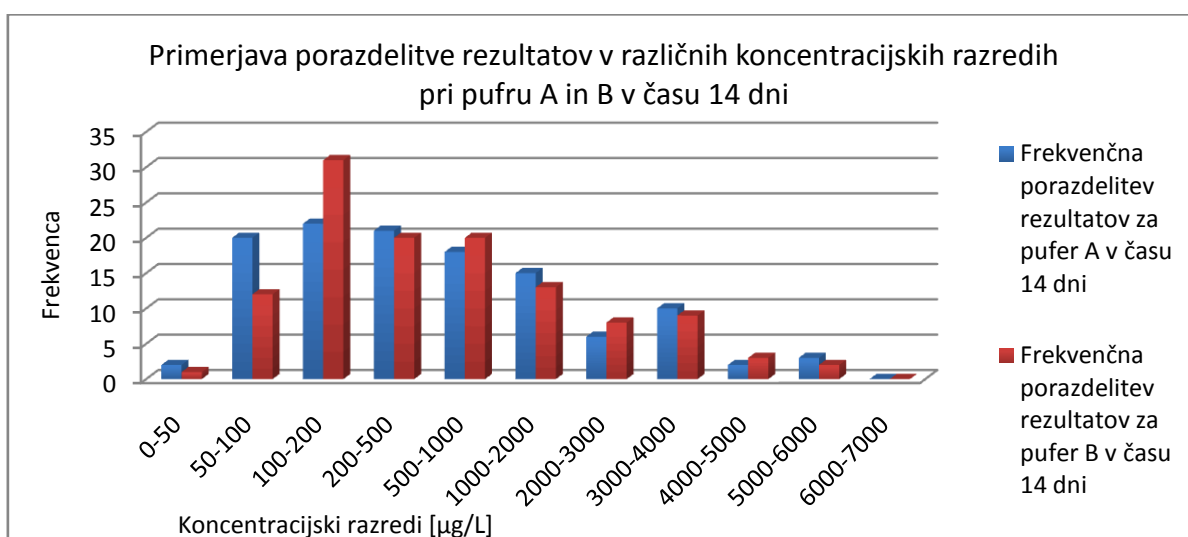
RAZPOREDITEV REZULTATOV PO INTERVALIH						
INTERVALI TESTA V $\mu\text{g/L}$	Pufer A 0. dan	Pufer A 14. dan	Pufer A 28. dan	Pufer B 0. dan	Pufer B 14. dan	Pufer B 28. dan
0-50	0	2	6	0	1	1
50-100	20	20	16	23	12	8
100-200	28	22	21	26	31	30
200-500	16	21	21	16	20	27
500-1000	19	18	13	20	20	14
1000-2000	19	15	19	21	13	19
2000-3000	7	6	12	5	8	8
3000-4000	8	10	4	7	9	6
4000-5000	2	2	6	1	3	6
5000-6000	0	3	0	0	2	0
6000-7000	0	0	1	0	0	0

Če primerjamo rezultate glede na koncentracijske intervale, lahko opazimo, da je največ pozitivnih rezultatov v območju med 50 in 200 $\mu\text{g/L}$. V času 0 smo pri pufru A v tem koncentracijskem intervalu izmerili 48 vzorcev blata in pri pufru B 49 vzorcev. Po 14 dneh ponovnega merjenja smo s pufrom A v tem območju dobili 42 vzorcev in s pufrom B 43. Po 28 dneh pa smo s pufrom A v tem območju dobili 37 vzorcev in s pufrom B 38. Najmanj rezultatov je v območju nad 4000 $\mu\text{g/L}$. Ne glede na čas merjenja, smo s pufrom A dobili 14 vzorcev in s pufrom B 12 vzorcev, ki so imeli koncentracijo hemoglobina nad 4000 $\mu\text{g/L}$. Slike 10, 11 in 12 nam prikazujejo primerjavo porazdelitve rezultatov, dobljenimi s pufrom A in B glede na koncentracijske razrede. V času 0 je največ vzorcev imelo koncentracijo hemoglobina v območju med 100 in 200 $\mu\text{g/L}$, in sicer je bilo s pufrom A takšnih vzorcev 28 in s pufrom B 26. Koncentracijo hemoglobina med 50 in 100 $\mu\text{g/L}$ pa je imelo 20 vzorcev s pufrom A in 23 s pufrom B. Nad 1000 $\mu\text{g/L}$ smo dobili s pufrom A 36 vzorcev in s pufrom B 34 (slika 10).



Slika 10: Primerjava koncentracijskih razredov pri pufru A in B v času 0

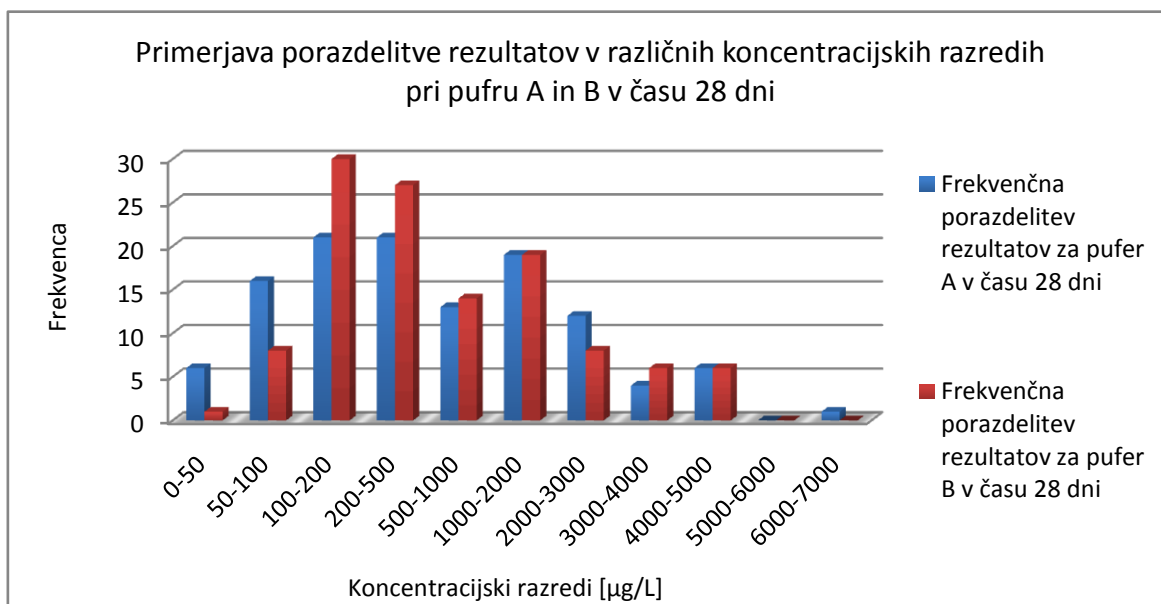
Po 14 dneh ponovnega merjenja vzorcev blata, smo ugotovili, da je pri pufru B prišlo do povečanega števila vzorcev, izmerjenih v območju med 100 in 200 $\mu\text{g/L}$, in sicer je bilo s pufrom A v tem območju 22 vzorcev, s pufrom B pa 31. V območju med 50 in 100 $\mu\text{g/L}$ pa smo opazili zmanjšanje števila vzorcev pri pufru B (12 vzorcev), medtem ko smo s pufrom A dobili enako število vzorcev kot 0. dan (20 vzorcev). Vrednost nad 1000 $\mu\text{g/L}$ je imelo s pufrom A 36 vzorcev in s pufrom B 35. Če pogledamo negativne rezultate, vidimo, da smo v tem času s pufrom A dobili 2, medtem ko s pufrom B le 1 negativen rezultat (slika 11).



Slika 11: Primerjava koncentracijskih razredov pri pufru A in B v času 14 dni

Tudi po 28 dneh smo opazili trend povečanja števila vzorcev v območju med 100 in 200 $\mu\text{g/L}$ pri pufru B. V tem območju je bilo pri pufru B 30 vzorcev, medtem ko smo pri pufru

A opazili zmanjšanje števila vzorcev glede na meritve 0. in 14. dan. Število vzorcev s pufrom A v tem območju je bilo 21. Lahko opazimo tudi zmanjšanje števila vzorcev pri pufru B v območju med 50 in 100 $\mu\text{g/L}$. Pri pufru B smo v tem območju dobili 8 vzorcev, medtem ko pri pufru A 16. Če primerjamo porazdelitve rezultatov tudi pri koncentraciji hemoglobina, ki so večje od 1000 $\mu\text{g/L}$, lahko opazimo, da se je število vzorcev s pufrom A povečalo na 42 in vzorcev s pufrom B na 39. Pri primerjavi negativnih rezultatov pa dobimo tem času s pufrom A 6 in s pufrom B 1 negativen rezultat (slika 12).



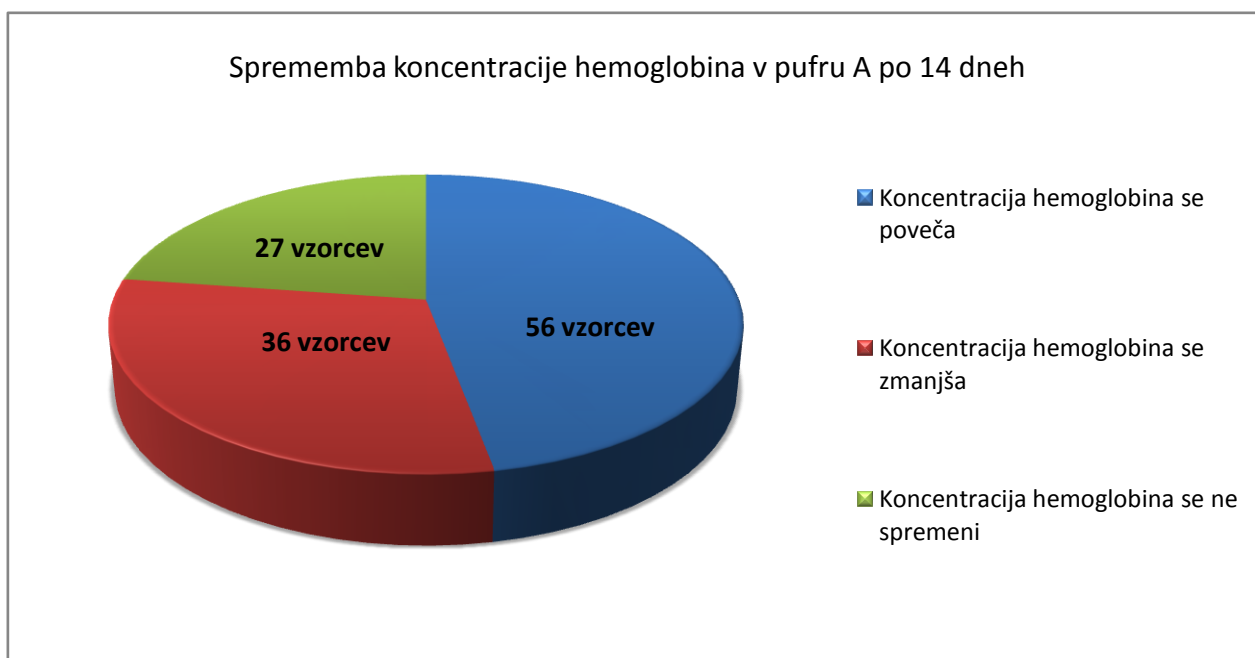
Slika 12: Primerjava koncentracijskih razredov pri pufru A in B v času 28 dni

Sklenemo lahko, da je prišlo s časom pri pufru A do zmanjšanja števila vzorcev v območju med 50 in 200 $\mu\text{g/L}$ ter do povečanja števila vzorcev v območju nad 1000 $\mu\text{g/L}$. Pri pufru B pa lahko vidimo, da se število vzorcev zmanjša v območju med 50 in 100 $\mu\text{g/L}$, medtem ko pri koncentraciji med 100 in 200 $\mu\text{g/L}$ pride do porasta števila vzorcev s časom.

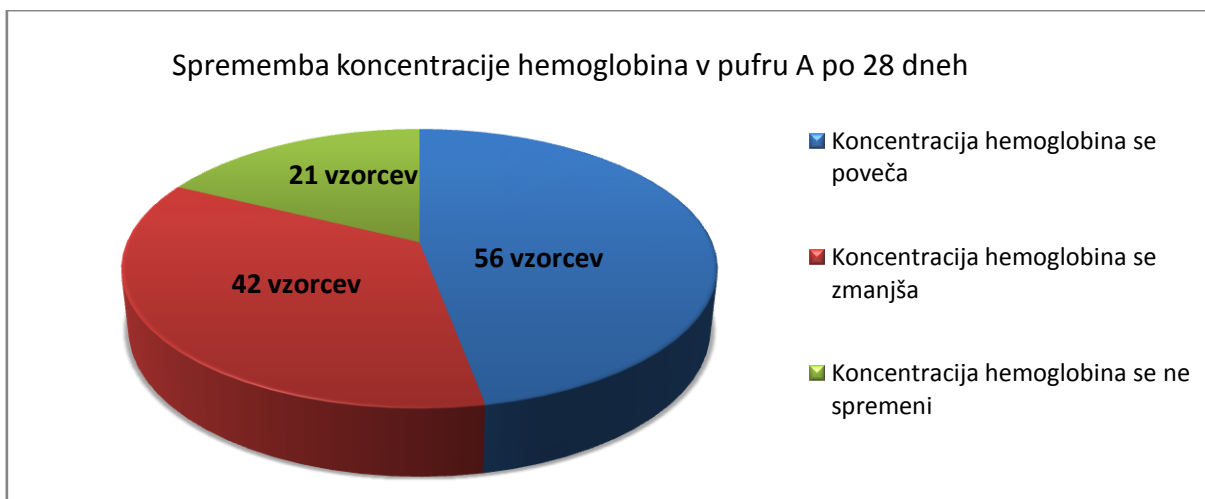
4.2.4 Primerjava pufra A in B glede na spremembo koncentracije hemoglobina s časom

Zaradi navedb proizvajalca, da so vzorci blata v pufru stabilni 7 dni pri temperaturi 20 do 25 $^{\circ}\text{C}$ in 14 dni pri temperaturi 2 do 10 $^{\circ}\text{C}$, smo pogledali, kako se koncentracija hemoglobina v naših vzorcih, shranjenih pri sobni temperaturi, spreminja glede na začetno meritev [22]. Primerjali smo spremembe koncentracije hemoglobina v vzorcih blata, v katerih se je koncentracija povečala, zmanjšala ali ostala enaka po 14. in 28. dnevu od začetne analize. Ugotovili smo, da se je pri pufru A koncentracija hemoglobina povečala pri 56 vzorcih v 14 in 28 dneh od začetka analize. Zmanjšanje koncentracije smo zasledili

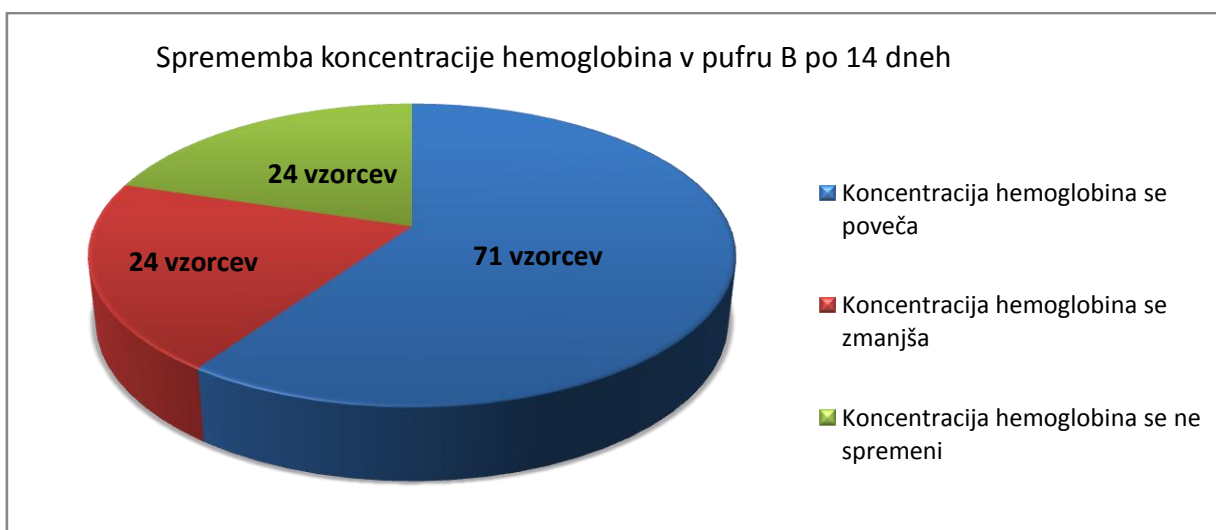
pri 36 vzorcih po 14 dneh in pri 42 vzorcih po 28 dneh merjenja. Glede na 95 % interval zaupanja smo dobili 27 vzorcev po 14 dneh in 21 vzorcev po 28 dneh merjenja, ki se jim koncentracija hemoglobina ni spremenila (sliki 13 in 14). Pri izvedbi metode s pufrom B pa smo dobili večje število vzorcev, ki se jim je koncentracija s časom povečala, in sicer po 14 dneh merjenja je bilo takšnih vzorcev 71 in po 28 dneh 68. Koncentracija hemoglobina se je zmanjšala v 24 vzorcih po 14 dneh in v 33 vzorcih po 28 dneh merjenja. Enako koncentracijo hemoglobina kot pri začetnem merjenju pa smo dobili v 24 vzorcih po 14 dneh in v 18 vzorcih po 28 dneh merjenja (sliki 15 in 16). Iz slik je razvidno, da so spremembe koncentracije hemoglobina s časom odvisne od vrste pufr, v katerem ekstrahiramo vzorec blata, vendar so spremembe koncentracije znotraj posameznega pufr konstantne. Pri pufru A so razlike nastale pri vzorcih, katerim se koncentracija ni spremenila ali se je zmanjšala. Razlika znaša 5 %. Pri pufru B so razlike večje, in sicer znašajo 8 % pri vzorcih, katerim se je koncentracija zmanjšala, 5 % pri vzorcih z enako koncentracijo ter 3 % pri vzorcih s povečanjem koncentracije hemoglobina s časom. Če primerjamo pufer A in pufer B, lahko ugotovimo, da s pufrom B dobimo večje število vzorcev, katerim se je koncentracija hemoglobina s časom povečala (71 vzorcev pri uporabi pufr B in 56 vzorcev pri uporabi pufr A).



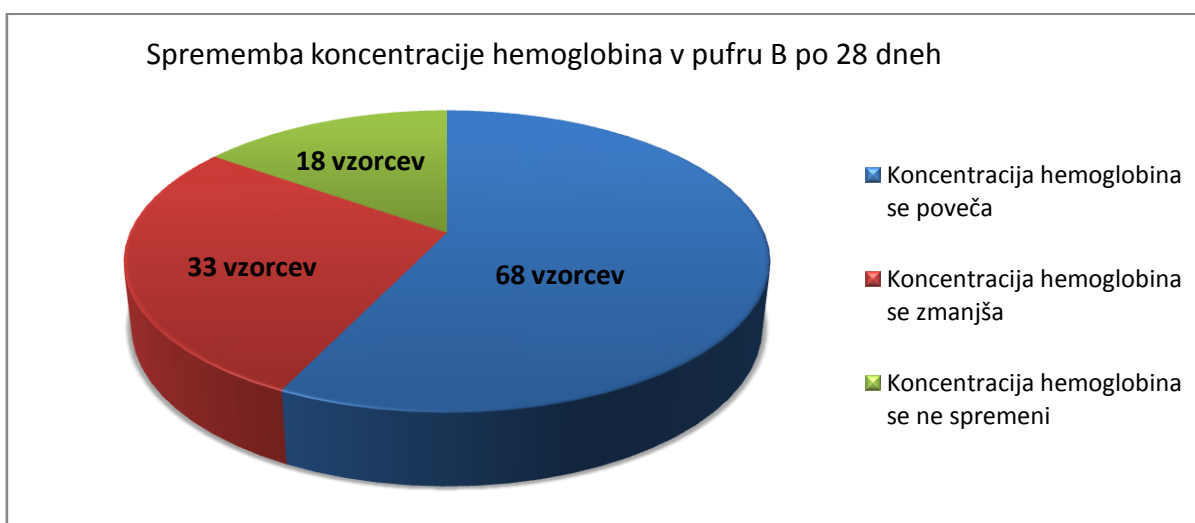
Slika 13: Sprememba koncentracije hemoglobina s časom pri pufru A po 14 dneh



Slika 14: Sprememba koncentracije hemoglobina s časom pri pufru A po 28 dneh



Slika 15: Sprememba koncentracije hemoglobina s časom pri pufru B po 14 dneh



Slika 16: Sprememba koncentracije hemoglobina s časom pri pufru B po 28 dneh

4.3 DOLOČITEV PRAŽNE VREDNOSTI PRI IMUNOKEMIJSKI KVANTITATIVNI METODI

Pražna koncentracija je najnižja smiselna koncentracija, ki ima klinični pomen in je tista vrednost hemoglobina v blatu, s katero opredelimo, ali je rezultat pozitiven ali negativen. Pri imunokemijski kvantitativni metodi je pražna koncentracija hemoglobina nastavljiva, in v našem primeru smo jo nastavili na $\geq 50 \mu\text{g/L}$ pufra. Pomembno je, da metoda ni preobčutljiva, saj s tem dobimo nizko klinično uporabnost zaradi zaznavanja fiziološke količine krvi v blatu, ki ne odraža prisotnosti bolezni. Prav tako pa metoda ne sme biti premalo diagnostično občutljiva, saj bi s tem spregledali rakava obolenja kolorektalnega trakta. Prag hemoglobina lahko nastavimo navzgor tako, da se pokriva s klinično pomembnimi rezultati, navzdol pa jo lahko pomaknemo samo do meje določitve, ki je objektivna omejitev metode. Za določitev pražne koncentracije se upoštevajo tudi stroški in dostop do kolonoskopije. Meja zaznavanja ali analitska občutljivost metode, je merilo za spoznavo čim manjše količine merjene snovi v vzorcu. V našem primeru je podana z najmanjšo spremembo koncentracije hemoglobina v vzorcu, ki ga še lahko zanesljivo zaznamo oziroma izmerimo [13,24]. Za našo metodo je analitska občutljivost $40 \mu\text{g/L}$ [22]. V članku je Levi s sodelavci ugotovil, da je pri pražni vrednosti $50 \mu\text{g/L}$ diagnostična občutljivost za klinično pomembne neoplazije (rak in napredovali polipi) 72,5 % in diagnostična specifičnost 88,6 %. Če pražno vrednost povečamo na $100 \mu\text{g/L}$ se diagnostična občutljivost zmanjša na 61,5 %, diagnostična specifičnost pa se poveča na 93,4 % [25].

V naši raziskavi smo naleteli na 17 vzorcev, ki so nihali med pražnima vrednostima, izmerjenima z metodo s pufrom A in z metodo s pufrom B (preglednica XIV). Pufer A je bil v tem primeru učinkovitejši, saj je bil pri 12 vzorcih rezultat meritev nad pražno vrednostjo, medtem pa smo pri istih vzorcih s pufrom B dobili negativen rezultat. Pri 5 vzorcih pa je bil rezultat meritev s pufrom B nad pražno vrednostjo in s pufrom A pod njo. Teh vzorcev v nadaljnjo raziskavo nismo uvrstili, se pa ob teh rezultatih postavlja vprašanje, ali pacienti nimajo patološkega parametra, ki ga merimo, ali je prišlo do napak v postopku analize ali pa pufra vplivata na analitsko občutljivost metode.

Čas, ki preteče od odvzema vzorca blata do analize v laboratoriju, je pomemben, saj lahko dobimo rezultate, ki ne odražajo dejanskega stanja pacienta. V naši raziskavi smo skušali ta vidik predstaviti z merjenjem vzorcev po 14., 28. in 63. dnevu od odvzema vzorcev. V

vmesnem času lahko pride do razpada hemoglobina in s tem do lažno negativnih ali pozitivnih rezultatov. Hemoglobin lahko v testnem pufru razpade, metoda zazna več epitopov in s tem pride do povišanega signala ali pa metoda ne zazna sestavine, ki je v vzorcu.

Preglednica XIV: Variiranje vzorcev glede na prazno vrednost

PUFER A [µg/L]	POZITIVEN/ NEGATIVEN REZULTAT	PUFER B [µg/L]	POZITIVEN/ NEGATIVEN REZULTAT
33	negativen	97	pozitiven
77	pozitiven	43	negativen
45	negativen	65	pozitiven
29	negativen	52	pozitiven
52	pozitiven	0	negativen
60	pozitiven	40	negativen
37	negativen	58	pozitiven
105	pozitiven	46	negativen
94	pozitiven	48	negativen
84	pozitiven	48	negativen
86	pozitiven	40	negativen
57	pozitiven	31	negativen
44	negativen	97	pozitiven
67	pozitiven	41	negativen
75	pozitiven	41	negativen
87	pozitiven	38	negativen
90	pozitiven	49	negativen

V naši raziskavi smo nastavili prazno koncentracijo hemoglobina na 50 µg/L (preglednica XV). Pri pufru A smo dobili 2 vzorca po 14 dneh in 6 vzorcev po 28 dneh merjenja, ki so bili pod nastavljenim pragom. Pufer B je v tem pogledu učinkovitejši, saj daje 1 negativni

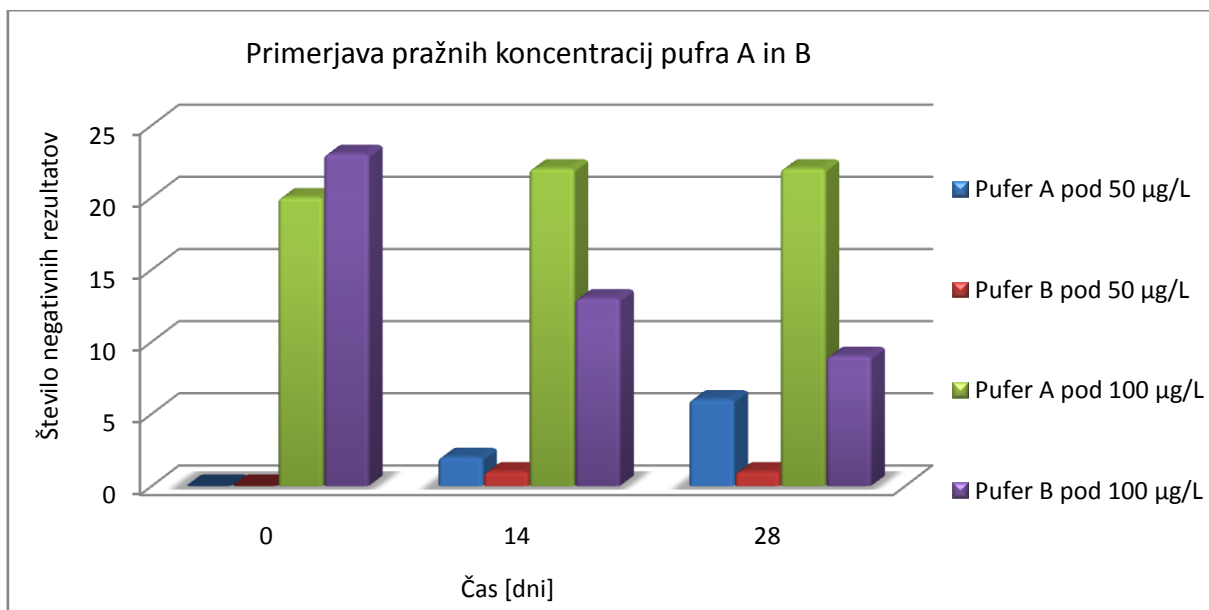
rezultat po 14. dnevu in 1 negativni rezultat po 28. dnevu merjenja. Pri presejalnem programu Svit, ki vključuje asimptomatsko prebivalstvo v starosti od 50 do 69 let, imajo določeno prazno vrednost hemoglobina 100 µg/L. Zato smo pogledali, koliko oseb bi v tem primeru izpustili iz programa. Naši rezultati kažejo, da bi v primeru testa s pufrom A izgubili 64 oseb in 45 oseb pri uporabi pufr A. Zato je pomembno določiti prazno vrednost, saj lahko na račun povečane diagnostične občutljivosti dobimo več lažno pozitivnih rezultatov, in s tem nepotrebno izpostavljanje bolnikov endoskopskim in drugim diagnostičnim preiskavam ter povišane stroške. Na račun manjše diagnostične specifičnosti pa lahko dobimo več lažno negativnih rezultatov, kar pomeni več prezrtih sprememb črevesne sluznice. Prazno vrednost določimo tako, da se med navidezno zdravimi odkrije tiste, ki imajo bolezen in se jih loči od tistih, ki je nimajo [26,27].

Preglednica XV: Število negativnih rezultatov glede na prazno vrednost hemoglobina

Pražna vrednost hemoglobina [µg/L]	PUFER A			PUFER B		
	Število vzorcev v času 0	Število vzorcev po 14 dneh	Število vzorcev po 28 dneh	Število vzorcev v času 0	Število vzorcev po 14 dneh	Število vzorcev po 28 dneh
pod 50	0	2	6	0	1	1
pod 100	20	22	22	23	13	9

Možnost izbire ustrezne prazne koncentracije je odvisna od populacije preiskovancev. Kadar gre za zmerno tveganje (nacionalni presejalni program) določimo vrednost 100 µg/L oziroma 17 µg/g blata, kadar pa imamo simptomatske preiskovance, kjer je potrebna občutljivejša diagnostika adenomov in malignih obolenj, pa prazno koncentracijo nastavimo na 50 µg/L oziroma 8,5 µg/g blata [28].

Slika 17 prikazuje primerjavo mejnih koncentracij, ki znašata 50 in 100 µg/L, med pufroma A in B. Iz slike je razvidno, da je pri 50 µg/L največ negativnih rezultatov pri pufru A v času 28 dni. Kadar pa prag nastavimo na 100 µg/L, dobimo največ negativnih rezultatov pri pufru B v času 0.



Slika 17: Primerjava praznih koncentracij pufra A in B

4.4 KONCENTRACIJA HEMOGLOBINA PO 63. DNEVU

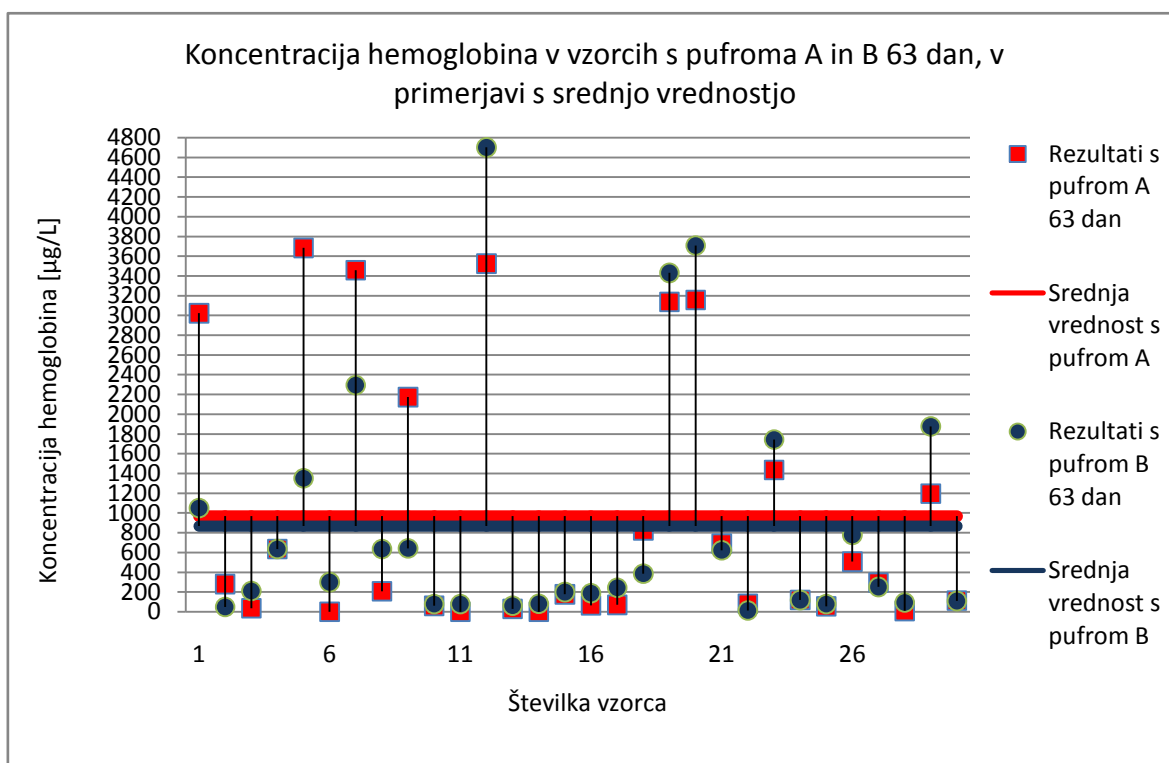
Zaradi rezultatov, ki so nakazovali, da bi bile lahko spremembe v izmerjenih koncentracijah hemoglobina posledica njegove termodinamske razgradnje (čas in temperatura), smo delu vzorcev izmerili vsebnost hemoglobina še po daljšem obdobju shranjevanja na sobni temperaturi, in sicer po 63. dnevu od začetnega merjenja. Rezultati, ki smo jih dobili, so prikazani v preglednici XVI.

Preglednica XVI: Rezultati meritev imunokemijske metode s pufrom A in B po 63 dneh

Št. vzorca	Pufer A [µg/L]	Pufer B [µg/L]	Št. vzorca	Pufer A [µg/L]	Pufer B [µg/L]	Št. vzorca	Pufer A [µg/L]	Pufer B [µg/L]
90	3023	1049	100	0	77	110	688	622
91	280	47	101	3526	4703	111	79	11
92	35	210	102	28	60	112	1435	1743
93	635	634	103	0	79	113	118	117
94	3685	1352	104	176	198	114	54	77
95	0	299	105	64	188	115	506	779
96	3459	2294	106	69	243	116	294	250
97	207	635	107	824	385	117	7	93
98	2173	642	108	3138	3432	118	1196	1876
99	59	77	109	3158	3709	119	113	108

Na sliki 18 so grafično prikazani rezultati meritev, dobljeni v pufri A in B po 63. dnevu od začetnega merjenja. Rezultate smo primerjali s srednjo vrednostjo, ki v primeru uporabe

pufra A znaša $976,63 \mu\text{g/L} \pm 486,16 \mu\text{g/L}$ ter v primeru uporabe pufra B $866,30 \mu\text{g/L} \pm 452,79 \mu\text{g/L}$. Razlika v njuni srednji vrednosti je 12,7 %. Dobljeni srednji vrednosti vzorcev s pufrom A in B sta manjši kot po 14. in 28. dnevu merjenja, vendar je tudi v tem primeru srednja vrednost, dobljena s pufrom A večja kot s pufrom B. Na sliki je razvidno, da je v primeru pufra A 9 meritev nad srednjo vrednostjo in v primeru pufra B 8.

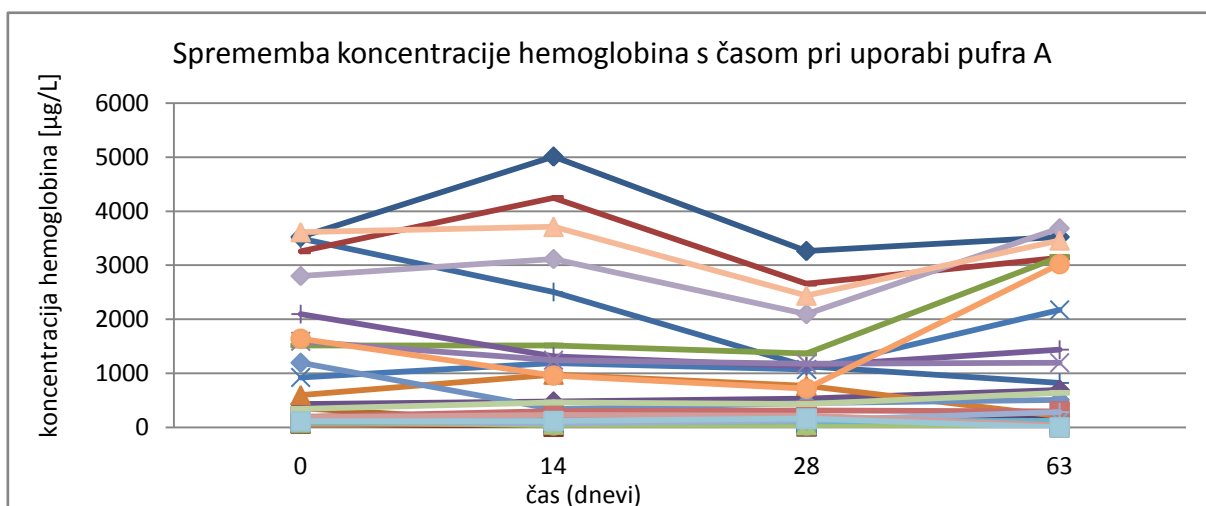


Slika 18: Koncentracija hemoglobina v vzorcih s pufroma A in B po 63 dneh

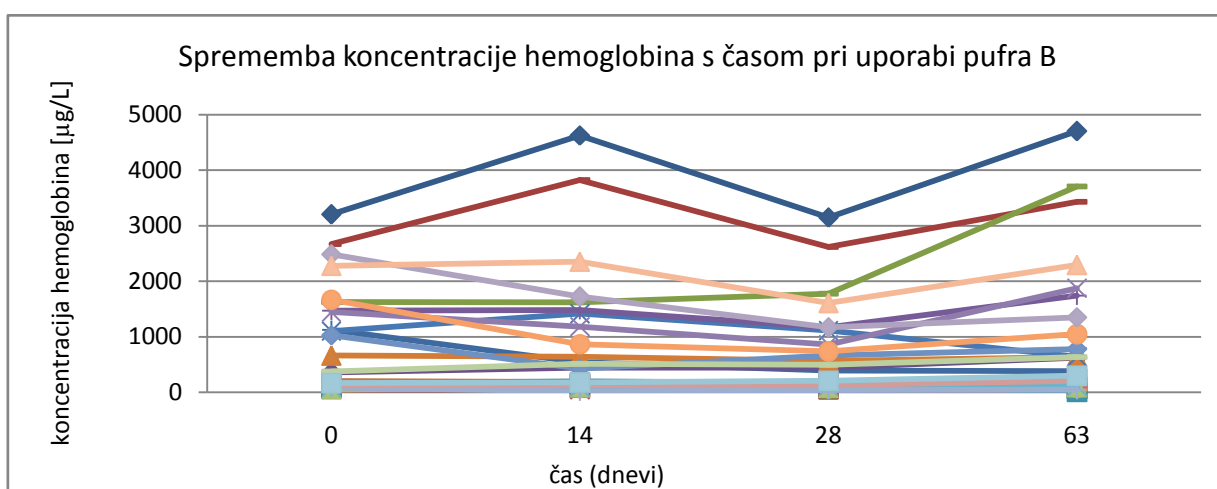
Pred nadaljnjo interpretacijo je potrebno opozoriti na dejstva, ki bi lahko pomembno vplivala na rezultate. Razlike med rezultati vzorcev, ki so bili ekstrahirani v pufru A in B, so nastale zaradi podaljšane shranjevanja vzorcev pri sobni temperaturi. Ker se z vsako meritvijo količina vzorca v epruveti zmanjša, lahko s tem pride do prevelike skoncentriranosti hemoglobina, njegove razgradnje ali njegove odstranitve iz vzorca. Pojav, ki se pojavi pri zelo visokih ali nizkih koncentracijah analita, preprečuje aglutinacijo, in vodi do lažno negativnih rezultatov meritev, ter ga imenujemo »prozona« učinek [22]. Proizvajalec zato predlaga, da se pri povišanih koncentracijah vzorec blata razredči z raztopino amonijevega pufra [16].

Zadnjih 30 vzorcev v naši raziskavi smo izmerili še 63. dan od začetka analize, in ob upoštevanju 95 % intervala zaupanja smo pri pufru A ugotovili, da se je 9 vzorcem koncentracija hemoglobina povečala glede na začetno meritev, 15 zmanjšala ter pri 6

ostala enaka. Pri 6 vzorcih smo dobili negativen rezultat, kar pomeni, da je bila njihova koncentracija hemoglobina pod pragom 50 $\mu\text{g/L}$. Pri uporabi pufru B pa se je 14 vzorcem koncentracija povečala, 10 zmanjšala ter pri 6 ostala enaka glede na začetno meritev. S pufrom B smo dobili le 2 negativna rezultata. Tudi po 63. dnevu, smo dobili podobne rezultate kot po 14. in 28. dnevu merjenja, in sicer pufer B daje manj negativnih rezultatov in večje število rezultatov, ki se jim s časom koncentracija hemoglobina v vzorcu poveča. Na slikah 19 in 20 je prikazan časovni potek koncentracije hemoglobina v pufru A in pufru B pri 30. vzorcih blata. Opazovali smo, kako se koncentracija hemoglobina spreminja s časom in ugotovili, da je večina vzorcev ostala v istem koncentracijskem območju. Pri nekaterih je vidno večje odstopanje, tako navzgor kot navzdol in niso konsistentne s časom – ne kažejo enakega trenda naraščanja in padanja s časom, temveč nihajo navzdol in navzgor.



Slika 19: Sprememba koncentracije hemoglobina v vzorcu blata s časom pri pufru A



slika 20: Sprememba koncentracije hemoglobina v vzorcu blata s časom pri pufru B

Na koncu lahko povzamemo, da je bil cilj naše raziskave primerjava med pufroma, ki se uporabljata v imunokemijski kvantitativni metodi. Pufer, ki smo ga poimenovali z A, se že uporablja v programu Svit, je učinkovit, vendar ima nekaj pomanjkljivosti, ki so jih v podjetju Eiken skušali odpraviti z izdelavo novejše sestave pufru, ki smo ga v naši raziskavi poimenovali z B. V podjetju Eiken so razvili pufer z namenom, da bi zmanjšali izgube hemoglobina do analize vzorcev, zato so ga obogatili s proteini, antioksidanti, stabilizatorji in solmi. Točna sestava pufov sodi v poslovno skrivnost podjetja Eiken, zato podrobnejše primerjave mehanizmov z vidika stabilnosti hemoglobina v okviru naše raziskave nismo obravnavali. Iz različnih virov lahko le sklepamo, da so razlike med pufroma A in B predvsem v različnih stabilizatorjih hemoglobina, kot so na primer goveji serum albumina, NaCl, spojina HEPES (N-2-hidroksietilpiperazin-N'-2-etansulfonska kislina), ki ima puferske lastnosti in funkcijo zaviranja avtooksidacije hemoglobina. Njen princip delovanja je razgradnja oksidanta peroksinitrita [5]. Razlika med pufroma A in B je v njuni sestavi, saj je pufru B dodan še kompleksen protein, ki še dodatno stabilizira molekulo hemoglobina, saj skupaj tvorita stabilen kompleks. Ta protein je α_2 -glikoprotein, ki veže prosti hemoglobin v gastrointestinalnem traktu in v imunokemijski metodi daje ta kompleks višje vrednosti koncentracije hemoglobina [5,29]. Pri tem nas je zanimalo, ali je diagnostika kompleksa hemoglobin – haptoglobin pri dokazovanju raka na debelem črevesu in danki, učinkovitejša, kot diagnostika s hemoglobinom. V študiji, v kateri je Sieg s sodelavci primerjal zaznavanje hemoglobina in kompleksa hemoglobin – haptoglobin v blatu, so ugotovili, da je diagnostična občutljivost s prvo metodo 87 % in z drugo 83 %. Nato so primerjali še zaznavanje adenomatoznih polipov po obeh metodah ter prišli do zaključka, da boljše rezultate daje metoda, ki zaznava kompleks hemoglobin – haptoglobin. Diagnostična občutljivost je bila v tem primeru 76 %. Pri metodi, ki temelji na zaznavanju hemoglobina, pa so določili diagnostično občutljivost 54 %. Pri tem velja, da je analitična občutljivost metode za zaznavo kompleksa hemoglobin – haptoglobin 2,0 $\mu\text{g/g}$ blata. Vidimo lahko, da ima imunokemijska metoda pri določanju kompleksa hemoglobin – haptoglobin v blatu primerljivo diagnostično občutljivost kot pri določanju hemoglobina v blatu ter značilno višjo diagnostično občutljivost za adenomatozne polipe [30].

Naša raziskava je narejena pri sobni temperaturi, pri čemer smo se zavedali, da je lahko temperatura eden od dejavnikov, ki vpliva na razlike v rezultatih. Po podatkih proizvajalca se pri sobni temperaturi v 72 urah razgradi celo 60 % hemoglobina v vzorcu [16]. Tudi študija, ki jo je naredil Grazzini s sodelavci v Italiji govori podobno in kaže, kako

temperaturna nihanja vplivajo na izvedbo in klinično učinkovitost metode. Raziskavo so izvedli pri sobni temperaturi in v različnih letnih časih, ter pri tem ugotovili, da sprememba temperature za 1 °C pomeni upad rezultatov pod prazno vrednostjo za 0,7 %. Na podlagi tega, so prišli do sklepa, da lahko letne temperaturne spremembe vplivajo na zaznavanje raka na debelem črevesu in danki. Poleti bi se tako zaradi povečane temperature lahko zmanjšalo število vzorcev nad prazno vrednostjo, kar z diagnostičnega vidika pomeni, da bi lahko spregledali osebe s kliničnimi znaki za rak debelega črevesa in danke. Ugotovili so tudi, da se je v poletnih mesecih verjetnost odkrivanja raka na debelem črevesu in danki ter adenomatoznih polipov za 13 % zmanjšala v primerjavi z zimskimi meseci [31].

Vzorci blata smo analizirali skozi daljše časovno obdobje (14 dni, 28 dni in 63 dni od začetne analize), in s tem skušali predstaviti vidik presejalnih programov, saj je znano, da je pri zdravljenju najpomembnejše zgodnje odkrivanje bolezni. Presejalni programi, ki za ugotavljanje prikrite krvavitve v blatu uporabljajo imunokemično metodo, delujejo tako, da preiskovanci dobijo po pošti dva kompleta testnih epruvetk, v katere sami odvzamejo dva vzorca blata v različnem časovnem obdobju. V blatu ugotavljamo prisotnost krvi, ki bi bila lahko posledica krvavitve zaradi tumorja debelega črevesa ali danke. Potrebno je poudariti, da polipi in maligne spremembe črevesne sluznice krvavijo le občasno, zato moramo preiskavo ponoviti vsaj dvakrat [32, 33]. Negativen rezultat pa ne pomeni, da bolnik nima raka, in da ob kliničnem sumu na raka ni potrebna nadaljnja diagnostika. Pri našem delu smo tako predstavili metodo kot učinkovito ne samo v diagnostiki, ampak tudi pri presejalnih programih, ter da z metodo lahko dobimo ponovljive rezultate na daljši rok (t. i. reproducibilnost). Tudi na Nizozemskem so opravili podobno študijo, kjer je Van Rossum s sodelavci preučeval, kako se koncentracija hemoglobina v blatu spreminja s časom, ki preteče od vzorčenja do dostave vzorcev v laboratorij. V študiji so naleteli na primer, kjer je pacient z napredujočim adenomom vrnil vzorec blata s tridnevno zamudo, pa vendar so mu izmerili koncentracijo hemoglobina pod pragom 50 µg/L. Ugotovili so, da se pri podaljšanem času vrnitve vzorcev blata v laboratorij, koncentracija hemoglobina v vzorcu zmanjša za približno 29 µg/L [34]. Študija nakazuje problematiko shranjevanja vzorcev v domačem okolju, pravilnega vzorčenja blata ter časovnega zamika vračanja epruvetk v laboratorij. Vsi ti parametri pomembno vplivajo na rezultat analize. V naši nalogi smo skušali ugotoviti tudi, pri kolikih vzorcih bi glede na različni časovni interval merjenja, dobili negativni rezultat. V diagnostičnih preiskavah in presejalnih programih je tudi pomembno, kakšno je ravnanje z biološkimi vzorci, in da je čas med odvzemom vzorca in analizo vzorca čim krajši.

Zakaj prihaja do takšnih razlik v koncentraciji hemoglobina v vzorcih blata, lahko pojasnimo tudi z lastnostmi hemoglobina, ki je kompleksna proteinska molekula. Pod vplivom okolja lahko izgubi funkcijske značilnosti (denaturacija), se razgradi na sestavne dele ali pa razpade. Vzroki za razpad hemoglobina so posledica kelatorjev, redukcije hema, superoksidnega radikala, sestave blata, proteaz enterobakterij, prebavnih encimov, oksidantov itd. [35, 36]. Hemoglobin je protein, sestavljen iz hema in globina, vzdolž prebavnega trakta se lahko razgradi in tako postane neprepoznaven za protitelesa v metodi. Po drugi strani pa se lahko zaradi delne razgradnje tetramerne strukture celo poveča dostopnost epitopov za protitelesa oziroma se celo poveča število epitopov, kar se posledično napačno pokaže kot povišana koncentracija hemoglobina. Protitelesa prepoznajo sorazmerno majhen del strukture antigena, zato lahko vežejo tudi sorodne strukture na drugih molekulah. To je osnova za navzkrižno reaktivnost [37]. Naslednja omejitev metode je tudi ta, da z njo ne moremo določiti fetalnega hemoglobina, saj pri njem metoda daje negativen rezultat [22]. Ker naš analit – hemoglobin ekstrahiramo iz blata, je tudi le-ta pomemben dejavnik končnega rezultata meritev. Blato oziroma feces je končni produkt presnove, z njim se iz telesa izloča voda, neprebavljene in neabsorbirane sestavine hrane ter izločki prebavnega trakta. Normalni vzorec blata tako vsebuje vodo, elektrolite, bakterije, celulozo, produkte črevesnega izločanja, žolčne pigmente (urobilinogen, sterkobilinogen in njihove oksidacijske produkte), proste maščobne kisline, lipide in dušikove spojine [38]. V blatu in kolonu najdemo tudi številne anaerobne komezalne bakterije, ki izločajo proteaze, te pa razgrajujejo proteine. Lastnost debelega črevesa je med drugim tudi izločanje nekaterih kovin, kot so svinec, živo srebro, bizmut, kalcij itd. Te kovine se kompleksirajo s hemoglobinom in tako lahko postane naš analit za metodo neprepoznaven [39]. Na naše rezultate pa lahko vpliva tudi uporaba zdravil pri pacientih, ki smo jih vključili v raziskavo. Levi in Brenner s sodelavci sta v različnih študijah ugotovila, da lahko pride pri jemanju acetilsalicilne kisline, nesteroidnih antirevmatikov in antikoagulantnih zdravil (varfarin, klopidoogrel) do povečanega tveganja krvavitve prebavil, in s tem do povečane diagnostične občutljivosti metode. Raziskovalci si pri tem niso enotnega mnenja, ali bi bilo potrebno pred vzorčenjem blata pri imunokemijski kvantitativni metodi prekiniti s terapijo. Vendar pa velja, da zdravila vplivajo na krvavitve iz že obstoječih neoplazem, in da se diagnostična občutljivost metode poveča tudi za 30 % [40,41]. Vsi ti dejavniki torej vplivajo na rezultate naših meritev, vendar so ti v veliki meri odvisni od variabilnosti bioloških dejavnikov preiskovancev.

Raziskava temelji na primerjavi med pufroma A in B oziroma primerjavi učinkovitosti, natančnosti in ujemanju rezultatov, pridobljenih z obema izvedbama metode (s pufrom A in B) ter predstavitvi vidika, ki je pomemben v presejalnem programu, in sicer kako se vzorec blata, ki je ekstrahiran v pufru obnaša skozi daljše časovno obdobje. Puфра A in B dajeta v imunokemijski kvantitativni metodi primerljive rezultate, vendar je njihovo ujemanje skozi različne časovne intervale meritev zmanjšano. Opazili smo, da daljši kot je časovni interval do meritev, večja so nihanja v koncentraciji hemoglobina. Pri tem bodo potrebne še nadaljne raziskave, ki bodo odgovorile, kaj se v tem času dogaja z molekulo hemoglobina v pufru ali pa nadaljevati v izboljšavi sestave puфра, da bo učinkovitejši pri stabilnosti hemoglobina in zmanjšal vpliv ostalih komponent blata.

5. SKLEP

V nalogi smo naredili primerjavo med rezultati, dobljenimi s pufroma A in B, v katerih smo ekstrahirali vzorce blata, namenjene za določanje koncentracije hemoglobina po imunokemijski kvantitativni metodi. Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo naslednje:

- Pri uporabi pufra A in B istega proizvajalca je v času 0 prišlo do pomembnih razlik, iz česar lahko sklepamo, da različna sestava pufra vpliva na končni rezultat meritev. Razlika v srednjih vrednostih je v času 0 največja in znaša 14,7 %. Ugotovili smo tudi, da je do največjega prekrivanja rezultatov, dobljenih s pufrom A in B, prišlo pri manjših koncentracijah hemoglobina, medtem ko je pri večjih koncentracijah prišlo do največjega odstopanja. Z metodo korelacije pa smo dokazali povezanost med vzorci, ekstrahiranih v pufri A in B, saj Pearsonov korelacijski koeficient znaša 0,931.
- Po 14., 28. in 63. dnevu shranjevanja vzorcev smo ugotovili, da ima sestava pufra vedno manjši pomen na rezultate metode. Razlike, ki nastanejo, so v veliki meri odvisne od heterogene sestave vzorca, konsistence blata, razgradnje hemoglobina in temperature shranjevanja. Po 14. dnevu merjenja smo ugotovili upadanje koncentracije hemoglobina v vzorcih, in v tem času smo s pufrom A v naši raziskavi izmerili minimalno koncentracijo hemoglobina 9 $\mu\text{g/L}$. Po 28. dnevu merjenja pa smo opazili ponovno naraščanje koncentracije hemoglobina, in v tem času smo s pufrom A izmerili maksimalno koncentracijo 6245 $\mu\text{g/L}$. Po daljšem času shranjevanja vzorcev prihaja torej do nihanja koncentracije hemoglobina navzdol in navzgor, vendar vrednosti kljub temu ostajajo v istem koncentracijskem območju. Pri primerjavi srednjih vrednosti je bila najmanjša razlika dosežena po 14. dnevu merjenja, in sicer 2,4 %. Po 28 dneh merjenja se razlika poveča na 4,7 %. Ujemanje rezultatov, dobljenih s pufrom A in B, smo ovrednotili še s korelacijskimi koeficienti in koeficienti variacije. Največjo povezanost rezultatov dobimo 14. dan merjenja, ko Pearsonov koeficient znaša 0,948, razlika v

koeficientih variacije pa 1,5 %. Po 28 dneh merjenja je Pearsonov koeficient 0,936, razlika v koeficientih variacije pa 3,9 %.

- V naši nalogi smo pokazali, da je pri obeh pufrih (A in B) prišlo do konstantnega naraščanja koncentracije hemoglobina v vzorcih blata ob časovnem intervalu merjenja. Pri pufru A se je v 14 in 28 dneh 56. vzorcem povečala koncentracija hemoglobina glede na začetno meritev. Pri pufru B je prišlo po 14 dneh do povečanja koncentracije hemoglobina pri 71. vzorcih in po 28 dneh pri 68. vzorcih.
- Tako pri presejalnih programih, kot tudi pri diagnostičnih preiskavah, je potrebno določiti takšno prazno vrednost, da zajame preiskovance z že izraženimi kliničnimi znaki, pri katerih je bolezen še neprepoznana, kot tudi preiskovance, pri katerih je bolezen že v napredovalem stadiju. Iz tega vidika je bil pufer B učinkovitejši, saj smo po daljšem časovnem intervalu (po 14 in 28 dnevih) dobili le dva vzorca blata, ki sta imela v imunokemijski metodi koncentracijo hemoglobina pod prazno vrednostjo. S pufrom A smo, v primerjavi, dobili osem takšnih rezultatov.
- Zaradi velikih odstopanj vzorcev v koncentraciji hemoglobina, smo zadnjih 30 vzorcev izmerili še 63. dan od začetka merjenja. Pri tem smo ugotovili, da je razlika med srednjima vrednostima, dobljena s pufrom A in B, 12,7 %. Če primerjamo rezultate glede na začetno analizo, lahko vidimo, da s pufrom A dobimo 6 negativnih rezultatov, s pufrom B pa le 2. Torej tudi po 63. dnevu merjenja opazimo podoben trend kot 14. in 28. dan, in sicer se pufer B uveljavi kot učinkovitejši, saj daje manj negativnih rezultatov.
- V raziskavi z uporabo imunokemijske metode, ki smo jo opravili v okviru te naloge, se je pufer B izkazal za zanesljivejši stabilizator hemoglobina v primerjavi s pufrom A, ki se trenutno uporablja v našem javnem zdravstvenem sistemu. Za dokončno odločitev o njegovi uporabi, pa so potrebne še nadaljnje raziskave, ki bi vključevale tudi podatke o kolonoskopiji.

6. LITERATURA

1. Melanson SF, Petersen J, Lewandrowski KB: Occult Blood. American Association for Clinical Chemistry 2006: 95 – 104.
2. Svit – državni program presejanja in zgodnjega odkrivanja predrakavih sprememb in raka na debelem črevesu in danki, Zbornik prve javne predstavitve politični in strokovni javnosti, medijem in nevladnim organizacijam, Ljubljana, 2007. http://www.program-svit.si/wp-content/uploads/2009/05/Zbornik_SVIT_prw.pdf
3. Rozen P, Waked A, Vilkin A, Levi Z, Niv Y: Evaluation of a desk top instrument for the automated development and immunochemical quantification of fecal occult blood. Medical Science Monitor 2006; 12 (6): MT1 – MT6.
4. Černe D, Ostanek B: Biomedicinska analitika I, učbenik za študente laboratorijske biomedicine, Ljubljana, 2012: 17 – 22.
5. Ugwu OS, Apte PS: The effect of buffers on protein conformational stability. Pharmaceutical Technology 2004: 86 – 113.
6. Vaje iz farmacevtske tehnologije 2, Katedra za biofarmacijo in farmakokinetiko, Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2002; 6.
7. Pivk B: Laboratorijska hematologija, Elanda, Ljubljana, 2003; 35 – 57.
8. Andoljšek D, Mlakar U. Celice rdeče vrste. V: Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D, uredniki. Interna medicina, Tretja izdaja, Ljubljana: Littera Picta; 2005. 1173 – 1176
9. Markovič S, Kocijančič B. Krvavitve iz prebavil. V: Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D, uredniki. Interna medicina, Tretja izdaja, Ljubljana: Littera Picta; 2005. 488 – 493
10. Zakotnik-Maučec J: Teden boja proti raku – Posvet "Rak, epidemija sodobnega sveta: Kako jo lahko preprečimo?", 7. 3.2013.
11. Zadnik V, Primic-Žakelj M: SLORA – Slovenija in rak, Epidemiologija in register raka, Onkološki inštitut Ljubljana. www.slora.si, 6.5.2013, 14.5.2013
12. Tepeš B, Stefanović M, Bračko M, Frkovič-Grazio S, Zakotnik-Maučec J, Novak-Mlakar D, Štabuc B: Rezultati pilotne faze presejalnega programa SVIT. Zdravniški vestnik 2010; 79: 403 – 411.
13. Kotnik V: Imunološki priročnik, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 2005:137 – 140.

14. Newman TB, Kohn MA: Evidence – based diagnosis, Cambridge University Press, New York, 2009: 116 – 138.
15. Koren P: Državni program presejanja in zgodnjega odkrivanja predrakavih sprememb in raka na debelem črevesu in danki – program Svit, http://www.zbornica-zveza.si/dokumenti/kongres_zbn/pdf/233D.pdf, 22.4.2013
16. Instructions for Use: OC – Auto 3 Latex Reagent, OC – Auto 3 Buffer, OC – Auto Sampling Bottle, OC – Standard, Eiken Chemical, 2011.
17. Halloran SP, Launoy G, Zappa M: European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. First Edition, Fecal occult blood testing, Guidelines, Endoscopy 2012; 44: SE65 – SE87.
18. Chew MH, Suzanah N, Ho KS, Lim JF, Ooi BS, Tang CL, Eu KW: Colorectal cancer mass screening event utilising quantitative faecal occult blood test. Singapore Medical Journal 2009; 50(4): 348 – 353.
19. Segnan N, Patnick J, Von Karsa L: European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis, First edition, European Union, 2010.
20. Vilkin A, Rozen P, Levi Z, Waked A, Maoz E, Birkenfeld S, Niv Y: Performance characteristics and evaluation af an automated – developed and quantitative immunochemical FOB screening test. American Journal of Gastroenterology 2005; 100: 2519 – 2525.
21. Mizutani S, Fumitani M, Kaneshiro E, Yamagnchi Y, Hayashi C, Noguchi S, Morimoto Y: Fundamental evaluation of fully automated fecal occult blood analyzer „OC – SENSOR – μ “. Japanese Journal of Medicine and Pharmaceutical Science 2002; 47 (5): 769 – 773.
22. Evaluation report: Immunochemical faecal occult blood tests, Purchasing and Supply Agency, Centre for Evidence – based Purchasing, 2009.
23. Adamič Š: Temelji biostatistike, druga izdaja, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 1995.
24. Levi Z, Rozen P, Hazazi R, Vilkin A, Waked A, Maoz E, Birkenfeld S, Leshno M, Niv Y: A quantitative immunochemical fecal occult blood test for colorectal neoplasia. Annals of Internal Medicine 2007; 146: 244 – 255.
25. Levi Z, Rozen P, Hazazi R, Vilkin A, Waked A, Maoz E, Birkenfeld S, Niv Y: Can quantification of faecal occult blood predetermine the need for colonoscopy in patients at risk for non – syndromic familial colorectal cancer? Alimentary Pharmacology and Therapeutics 2006; 24: 1475 – 1481.

26. Castiglione G, Grazzini G, Miccinesi G, Rubeca T, Sani C, Turco P, Zappa M: Basic variables at different positivity thresholds of a quantitative immunochemical test for faecal occult blood. *Journal of Medical Screening* 2009; 9: 99 – 103.
27. Grazzini G, Visioli CB, Zorzi M, Ciatto S, Banovich F, Bonanomi AG, Bortoli A, Castiglione G, Cazzola L, Confortini M, Mantellini P, Rubeca T, Zappa M: Immunochemical faecal occult blood test: number of samples and positivity cutoff. What is the best strategy for colorectal cancer screening? *British Journal of Cancer* 2009; 100: 259 – 265.
28. Rubeca T, Rapi S, Confortini M, Brogioni M, Grazzini G, Zappa M, Puliti D, Castiglione G, Ciatto S: Evaluation of diagnostic accuracy of screening by fecal occult blood testing (FOBT). Comparison of FOB Gold and OC sensor assay in a consecutive prospective screening series. *The International Journal of Biological Markers* 2006; 21 (3): 157 – 161.
29. Karas-Kuželčki N, Mencej-Bedrač S, Mlinar B, Ostanek B, Trošt Z: Vaje iz klinične kemije II, Študijsko gradivo, Katedra za klinično kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2011: 15 – 27.
30. Sieg A, Thoms C, Luthgens K, John MR, Schmidt-Gayk H: Detection of colorectal neoplasms by the highly sensitive hemoglobin – haptoglobin complex in feces. *International Journal of Colorectal Disease* 1999; 14: 267 – 271.
31. Grazzini G, Ventura L, Zappa M, Ciatto S, Confortini M, Rapi S, Rubeca T, Visioli B C, Halloran PS: Influence of seasonal variations in ambient temperatures of performance of immunochemical faecal occult blood test for colorectal cancer screening: observational study from the Florence district. *Gut* 2010: 1 – 5.
32. Bunc-Tušek K, Kersnik J: Zgodnje odkrivanje raka v družinski medicini – prikaz na modelu raka debelega črevesa in danke. *Zdravniški vestnik* 2006; 76: 787 – 794.
33. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Smith RA, Brooks D, Andrews KS, Dash C, Giardiello FM, Glick S, Levin TR, Pickhardt P, Rex DK, Thorson A, Winawer SJ: Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps. A Joint Guideline from American Cancer Society, the US Multi – Society Task Force on Colorectal Cancer and the American College of Radiology, *A Cancer Journal for Clinicians* 2008; 58 (3): 130 – 160.
34. Van Rossum LGM, Van Rijn AF, Van Oijen MGH, Fockens P, Laheij RJF, Verbeek ALM, Jansen JBMJ, Dekker E: False negative fecal occult blood tests due to delayed

- sample return in colorectal cancer screening. *International Journal of Cancer* 2009; 125: 746 – 750.
35. Zuchner T: Working with proteins: proteins stability and storage; dosegljivo na www.uni-leipzig.de/uspdul/teach.htm, 20.6.2013
36. Rozen P, Comaneshter D, Levi Z, Hazazi R, Vilkin A, Maoz E, Birkenfeld S, Niv Y: Cumulative evaluation of a quantitative immunochemical fecal occult blood test to determine its optimal clinical use. *Cancer* 2010; 116(9): 2115 – 2125.
37. Gorenjak M: Osnove imunokemijskih metod, Seminar za tehnike laboratorijske medicine, Zbornik predavanj, Slovensko združenje za klinično kemijo, 2002.
38. Avberšek-Lužnik I: Priporočeni postopki za laboratorijske preiskave blata, Slovensko združenje za klinično kemijo, Ljubljana, 2000: 1 – 7.
39. Hafner M, Markovič S, Štabuc B. Bolezni debelega črevesa. V: Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D, uredniki. *Interna medicina*, Tretja izdaja, Ljubljana: Littera Picta; 2005. 530 – 543
40. Levi Z, Rozen P, Hazazi R, Vilkin A, Waked A, Maoz E, Birkenfeld S, Lieberman N, Klang S, Niv Y: Sensitivity, but not specificity, of a quantitative immunochemical fecal occult blood test for neoplasia is slightly increased by the use of low – dose aspirin, NSAIDS, and anticoagulants. *The American Journal of Gastroenterology* 2009; 104(4): 933 – 938.
41. Brenner H, Tao S, Haug U: Low – dose aspirin use and performance of immunochemical fecal occult blood tests. *The Journal of the American Medical Association* 2010; 304(22): 2513 – 2520.