

# Kvantitativní stanovení hemoglobinu ve stolici

L. Dubská, J. Nechvátal

## ÚVOD

V České republice je kolorektální karcinom (KRK) druhým nejčastějším nádorovým onemocněním trávicího traktu. Úmrtnost na tyto nádory je relativně vysoká (7-8 % nádorových úmrtí) (1, 9), což nepochybně souvisí s tím, že nádory jsou zjištěny až v pokročilém stádiu. Incidence KRK je větší u mužů než u žen (10) a stoupá s věkem. Každý rok je diagnostikováno zhruba 8000 nových onemocnění a téměř 5000 pacientů zemře, pokud je však KRK zjištěn v časném stádiu, patří mezi nejlépe léčitelné nádory (8). Prevence kolorektálního karcinomu zahrnuje:

- Oblast primární prevence (zlepšení kvality životního prostředí, změna stravovacích návyků atd.).
- Oblast aplikace metod molekulární genetiky (rodokmen rodiny probanda, identifikace postižených a rizikových osob, určení typu dědičnosti, cytogenetika aj.). Nejnovější screeningové metody jsou založeny na detekci specifických mutací metodami PCR nebo biočipovou technologií v DNA izolované ze stolice. Pro detekci nádorů tlustého střeva lze ze vzorku stolice stanovovat mutace APC, K-ras, p53 a detekovat mikrosatelitní instabilitu (MSI) markerem bAT-26, případně další genetické markery (4).
- Oblast sekundární prevence (depistáž – masový screening, časná diagnostika – kolonoskopie, profylaxe – endoskopická polypektomie a dispenzarizace). Screening se provádí standardizovaným testem na okultní (okem nepostřehnutelné) krvácení (TOKS, FOBT), je součástí onkologické prevence u symptomatických jedinců obou pohlaví ve věku nad 50 let s opakováním v jedno nebo dvouletém intervalu. Z celkového počtu pozitivních TOKS lze následující kolonoskopii zjistit u 10-20 % kolorektální karcinom (KR-CA), u 15-30 % polypy a u 40-50 % jiný zdroj krvácení. Při jednorázovém screeningu se odhalí v asymptomatické populaci přibližně 80-90 % KR-CA a 50-60 % adenomových polypů (1).

TOKS je založen na skutečnosti, že většina kolorektálních karcinomů a větších adenomů ztrácí u asymptomatických jedinců intermitentně do sto-

lice malé množství krve, které lze testem na okultní krvácení detekovat.

## METODY STANOVENÍ

Metody stanovení okultního krvácení (resp. hemoglobinu ve stolici) lze rozdělit do tří skupin:

1. **metody založené na principu pseudoperoxidázové aktivity** natráveného hemoglobinu (detekce hemu), který v přítomnosti alkoholového roztoku peroxidu vodíku katalyzuje přeměnu redukované formy pryskyřice (bezbarvé), příp. jiného substrátu, na formu oxidovanou (modrou) (guajakové testy, gFOBT). Reakce vyžaduje uvolnění hemoglobinu z erytrocytů a jeho částečné natrávení. K tomu dochází v trávicí trubici účinkem proteolytických enzymů. Citlivost testu je proto nízká na detekci čerstvé krve při afekcích konečnicku. Falešně pozitivní výsledek testu může být způsoben požitím většího množství červeného masa (event. syrového), některých druhů ovoce a zeleniny (rostlinné peroxidázy) a užitím nesteroidních antirevmatik a léků obsahujících kyselinu acetylsalicylovou. Falešně negativní nálezy mohou být způsobeny vysokými dávkami vitamínu C nebo pozdě provedenou detekcí testu. Tyto metody jsou vhodné pro depistážní programy. Citlivost vybraných guajakových testů (Haemofec: 4 ml krve/100 g stolice, Haemoccult: 1-2 ml krve/100 g stolice, Colorektal: 1 ml krve/ 100 g stolice, Faecaltest: 0,25 – 0,5 ml krve/100 g stolice)
2. **metody na imunochemickém principu** (iFOBT): hemaglutinační (např. Heme-Select), latexová imunoprecipitace (např. Hemolex), radiální imunodifúze, imunoafinitní chromatografie (např. ImmoCare, Hexagon OBTI). Detekce lidského hemoglobinu monoklonální protilátkou (detekce globinu) vylučuje možnost ovlivnění jiným zdrojem hemoglobinu (potrava), odpadá interference chemických látek, není nutná speciální dieta. Tyto metody jsou výrazně citlivější (BM-Colo-Albumin: 0,5 ml krve/100 g stolice, Hexagon OBTI: 0,15-0,3 ml krve/100 g stolice, průměrně cca 0,1 mg Hb/g stolice) než guajakový test, poskytují však 4-7 % falešnou pozitivitu (7). Imunochemické testy jsou vhodné k detekci, příp. vyloučení krvácení u symptomatických nemocných. Senzitivita a pozitivní průkaz je výrazně ovlivněn rozdílnou degradací obou složek hemoglobinu. Globin je degradován mnohem rychleji a pozitivita imunochemických testů téměř eliminuje detekci krvácení v horní části trávicí trubice. Degradace hemu je výrazně

pomalejší, proto chemicky orientované testy FOBT mohou reagovat i na krvácení z vyšších oblastí GIT případně i na krvácení z dásní.

a. Kvantitativní stanovení hemoglobinu – iFOBT – koreluje s mírou krvácení prekanceróz (adenomů) a nádorů tlustého střeva. Většina v současnosti dostupných analyzátorů je japonské výroby (firmy Wako, Eiken, Jokohi). V Evropě je dostupný pouze systém OC-Senzor- $\mu$ , distribuovaný v ČR firmou Dialab spol. s r.o. ROC křivky prokazují specifitu pro pokročilé adenomy 95,3 % při citlivosti 100 ng Hb/ml. Porovnání gFOBT a iFOBT metodou OC Senzor prokazuje 3x větší záchyt pokročilých adenomů a karcinomů iFOBT metodou (7).

3. **metoda fluorescenční** - stanovení hem-porfy-rinů, pro rutinní screening nevhodná

## OC-SENZOR- $\mu$ - ANALYZÁTOR PRO KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ HEMOGLOBINU VE STOLICI

Analyzátor japonské firmy Eiken umožňuje kvantitativní stanovení lidského hemoglobinu ve stolici. Stanovení je založeno na latex aglutinační imunoturbidimetrické reakci s protilátkou k A0 lidskému hemoglobinu. Metoda stanovuje hemoglobin pomocí vícenásobné reakce s monoklonální protilátkou k Hb A0 IgG. Vlastní analýza je prováděna turbidimetrickým měřením při 600 nm, kalibrace je šestibodová v rozsahu 20-2000 ng Hg/ml. Systém zahrnuje interní kontrolu kvality. Identifikace vzorků je řešena interní čtečkou čárových kódů. Inkubační blok je temperován na 37 °C, reagenční blok na 25 °C. Detekční jednotkou je křemíková fotodioda. Analyzátor umožňuje externí komunikaci RS 232C, na OKBHI-NNH je analyzátor on-line napojen na LIS INFOLAB. Kapacita analyzátoru je 80 vzorků za hodinu. Zdroj světla: LED 660 nm, kyvety: 5 mm akrylové, kapacita zásobníku: 10 kyvet, kapacita paměti: 999 testů, zabudována termální tiskárna (2).

V odběrové nádobce pro vzorek je zajištěno odseparování definovaného objemu vzorku (10 mg) protlačením odběrového kartáčku přes definované septum a extrakce vzorku ve 2 ml stabilizujícího pufru. V analyzátoru je kazeta stisknuta a dochází k protlačení extraktu stolice filtrem do nástřikové jamky pod aluminiovou fólií. Tato fólie je perforována a nástřik 25  $\mu$ l extraktu je jehlou aplikován do měřicí kyvety (3).

Pro účely screeningu je rozhodující otázkou nastavení cut-off hodnoty. Za fyziologických podmínek jsou denní ztráty krve stolicí 0,5-2,5 ml, což činí cca

0,3-1,3 mg hemoglobinu na 1 g stolice. (detekční cut-off pro standardní Haemoccult je cca 5 mg Hb/g stolice) (4). ROC křivky zahraničních studií prokazují specifitu pro pokročilé adenomy a karcinomy 95,3 % při citlivosti 100 ng Hb/ml. Senzitivita gi FOBT testu 85,7 % při cut-off 100 ng/ml je cca 3x vyšší než senzitivita gFOBT. Shodné výsledky prokazuje holandská studie – 3x vyšší pozitivita giFOBT testu než guajakového testu umožňuje 3x vyšší záchyt kolorektálních tumorů (5). Firma doporučuje pro detekci kolorektálních tumorů základní hodnotu cut-off 100 ng Hb/ml (specifita 95,3 %, senzitivita 76,5 %) (6).



*Obr.1. Přístroj OC-Senzor- $\mu$  (Eiken) pro kvantitativní stanovení hemoglobinu ve stolici.*

## ZKUŠENOSTI Z PROVOZU ANALYZÁTORU OC-SENZOR- $\mu$

Na OKBHI NNH byl analyzátor instalován v říjnu 2008. Obsluha je nenáročná, zaškolení laboratorního personálu nevyžadovalo velké časové náročnosti. Analyzátor je v provozu 1x týdně, obvykle v pátek. Měření jsou série patientských vzorků včetně interní kontroly kvality.

**Stabilita vzorků:** 24 h při laboratorní teplotě, do 7 dnů při 8 °C, do 1 měsíce při -20 °C (před analýzou je třeba vzorky vytemperovat na laboratorní teplotu).

**Kalibrace:** Ke kalibraci se používá OC-Standard, lyofilizát HbA0 se rozpouští 1 ml destilované vody. Kalibrační řadu si vytvoří analyzátor automaticky.

**Kontroly:** K dispozici jsou kontroly na 2 hladinách: LOW s koncentrací Hb cca 120-180 ng/ml a HIGH s koncentrací hemoglobinu cca 480-720 ng/ml. Po rozpuštění lze alikvoty kontrol skladovat až 1 měsíc při -20 °C.

**Stabilita reagensů:** Při uchování v lednici jsou reagensy stabilní do data expirace.

**Údržba:** Při týdenním cyklu měření provádíme po každém měření „týdenní údržbu“, tj. otření povrchu analyzátoru a otření držáku reagensů. V rámci měsíční údržby je prováděna očista vzorkové a reagenční jehly a čištění vzorkového racku.

**Servis:** zajišťuje firma Dialab spol. s r.o. se sídlem v Praze.

## ZÁVĚR:

Testy na okultní krvácení jsou v dnešní době neoddělitelnou součástí gastroenterologických vyšetření. Dle principu stanovení jsou vhodnou pomůckou pro masový screening nebo pro vyšetřování rizikových skupin pacientů a pro monitorování léčby pacientů s kolorektálním karcinomem.

## LITERATURA:

1. Kolorektální karcinom – screening a dispenzarizační programy, doporučené postupy pro praktické lékaře. Projekt MZ ČR zpracovaný ČLS JEP.
2. Kocna P., Vaníčková Z. a kol.: Detekce okultního krvácení ve stolici a screening kolorektálních nádorů. Interní sdělení.

3. Kvantitativní stanovení hemoglobinu ve stolici – Wikiskripta
4. Screening nádorů tlustého střeva – Wikiskripta
5. Kocna P., Vaníčková Z. a kol.: Detekce okultního krvácení ve stolici a screening kolorektálních nádorů. – poster
6. Příbalový leták k soupravě OC-senzor  $\mu$ , FOBT. Dialab, Praha 5
7. Testy okultního krvácení ve stolici – Wikiskripta
8. Zavoral M., Suchánek Š., Frič P.: Využití testů na okultní krvácení do stolice ve screeningu kolorektálního karcinomu, Med. Pro Praxi 2008; 5(11): 417-419
9. Tyburec J., Keil R. a kol.: Vyšetření stolice na okultní krvácení a záchyt kolorektálního karcinomu u souboru pacientů kolonoskopovaných ve KN Motol v letech 2002-2005. Bulletin HPB chirurgie, ročník 14, 2006 č.1-2
10. Bc. Levová J.: Kolonoskopické nálezy u pacientů s pozitivním testem na okultní krvácení a výtěžnost testu screeningu kolorektálního karcinomu v letech 2002-2007. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Fakulta zdravotnických studií.