

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Screening kolorektálního karcinomu – laboratorní diagnostika**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	Dita Raiskubová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Lucie Roubalová
Termín odevzdání práce:	2014

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora	Dita Raiskubová
Název práce	Screening kolorektálního karcinomu – laboratorní diagnostika
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení klinické biochemie FNOL
Vedoucí práce	Mgr. Lucie Roubalová
Rok obhajoby práce	2014

### **Abstrakt**

Kolorektální karcinom (CRC) patří k nejčastějším maligním onemocněním ve vyspělých státech světa. Česká republika zaujímá vedoucí postavení ve světových statistikách incidence a mortality CRC. Screening CRC je zaměřen na bezpříznakové jedince od 50 let věku. Současně používané metody screeningových vyšetření kolorektálního karcinomu zahrnují jednak metody laboratorní a dále metody zobrazovací.

Bakalářská práce je zaměřena na možnosti laboratorního screeningu CRC. K základním laboratorním testům patří test na okultní krvácení do stolice (FOBT). V praxi byl donedávna používán starší test guajakový (gFOBT), postupně byly vyvinuty novější testy imunochemické (iFOBT). V současné době nejpřesnější metodou stanovení okultního krvácení, vhodnou pro screening CRC, je kvantitativní analýza lidského hemoglobinu ve stolici (qiFOBT). Souběžně jsou testovány jako možné screeningové metody kolorektálního karcinomu i různé typy biomarkerů. Jako nejvhodnější pro screening CRC se jeví detekce hypermetylované DNA v2 úseku genu pro septin 9 v krevní plazmě.

K diagnostice kolorektálního karcinomu slouží i zobrazovací screeningové metody, především screeningová kolonoskopie.

Klíčová slova	Kolorektální karcinom (CRC), FOBT, Septin 9
Počet stran	55
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Author's first name	
and surname	Dita Raiskubová
Title of thesis	Screening of colorectal cancer – laboratory diagnostics
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of clinical biochemistry FNOL
Supervisor	Mgr. Lucie Roubalová
Year of presentation	2014

### **Abstract**

Colorectal cancer (CRC) is the most common disease in developed countries around the world. The Czech Republic is on the top of statistics charts of an incidence and mortality of CRC. Screening of CRC is focused on 50 year-old and older healthy people. The currently used methods of screening tests for colorectal cancer include both laboratory methods and imaging methods.

Bachelor thesis is focused on the options of laboratory screening of CRC. Basic methods used in screening are tests of fecal occult bleeding (FOBT). Older guajac test (gFOBT) was recently used in practise, gradually there is new imunochemical test (iFOBT) developed. Nowadays the most specific method of determination fecal occult bleeding is a quantitative analysis of human hemoglobin in a stool (qiFOBT). Side by side many types of biomarkers are tested. The most suitable for screening of CRC seems to be a detection of hypermethylated DNA in a v2 part of a gene septin 9 in blood plasma.

For laboratory diagnostics are used screening imaging methods as well, mainly screening colonoscopy.

Keywords	Colorectal cancer (CRC), FOBT, Septin 9
Number of pages	55
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem uvedenou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne \_\_\_\_\_

Poděkování:

Děkuji Mgr. Lucii Roubalové za odborné vedení, cenné připomínky, rady a poskytnuté materiály při tvorbě bakalářské práce. Mé poděkování patří také pracovníkům Oddělení klinické biochemie a Laboratoře růstových regulátorů za ochotu a vstřícnost. Za podporu a pochopení zvláště děkuji své rodině.

## OBSAH

Seznam zkratek	8
Cíle práce	9
TEORETICKÁ ČÁST	10
1 Úvod	11
2 Problematika kolorektálního karcinomu	12
2.1 Určení rozsahu kolorektálního karcinomu	12
2.2 Epidemiologie kolorektálního karcinomu	14
2.2.1 Incidence a mortalita v Evropě a ve světě	14
2.2.2 Incidence a mortalita v České republice	14
2.3 Etiologické faktory kolorektálního karcinomu	16
2.3.1 Vliv vnějších faktorů	16
2.3.2 Vliv dědičných faktorů	17
2.3.3 Predisponující vlivy	17
3 Geneze a klinický obraz kolorektálního karcinomu	18
3.1 Iniclace onemocnění CRC	18
3.2 Klinický obraz CRC	20
4 Diagnostika a screening kolorektálního karcinomu	21
4.1 Situace v Evropě a ve světě	22
4.2 Situace v České republice	23
4.3 Screeningová kolonoskopie	25
4.4 Možnosti laboratorního screeningu	25
4.4.1 Testy 1. generace gFOBT	27
4.4.2 Testy 2. generace iFOBT	30
4.4.3 Testy 3. generace qiFOBT	32
4.4.4 Nové biomarkery, Septin 9	35
PRAKTICKÁ ČÁST	37
5 Stanovení qiFOBT	38
5.1 Materiál a přístrojové vybavení	38
5.2 Biologický materiál	38
5.3 Princip metody	40
5.4 Pracovní postup	41

6	Výsledky	42
7	Diskuze	47
8	Závěr	51
	Seznam použité literatury	52

## Seznam zkratek

ACS	The American Cancer Society
APC	adenomatosis polyposis coli
CRC	kolorektální karcinom
CT	počítačová tomografie
DCC	deleted in colorectal carcinoma
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EPE	endoskopické polypektomie
FOBT	test na okultní krvácení do stolice
gFOBT	guajakový test na okultní krvácení do stolice
GIT	gastrointestinální trakt
GTP	guanosintrifosfát
FN	falešně negativní
FP	falešně pozitivní
Hb	hemoglobin
IARC	International Agency for Research on Cancer
iFOBT	imunochemický test na okultní krvácení do stolice
MRI	magnetická rezonance
MZČR	Ministerstvo zdravotnictví České republiky
ng	nanogram
NOR	Národní onkologický registr
OKB FNOL	Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc
PCR	polymerázová řetězová reakce
qiFOBT	kvantitativní test na okultní krvácení do stolice
SEPT9	Septin 9
SN	správně negativní
SP	správně pozitivní
TNM	tumor noduli metastases
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
TIS	tumor in situ
VFN	Vojenská fakultní nemocnice
WHO	Světová zdravotnická organizace
μg, μl	mikrogram, mikrolitr



## **Cíle práce**

- Vypracování literární rešerše k dané problematice -Screeningové metody pro detekci kolorektálního karcinomu se zaměřením na laboratorní diagnostiku, parametry metod používaných k screeningu, shrnutí, srovnání možností vyšetřování v ČR a v zahraničí
- Popsat základní algoritmus pro vyšetřování kolorektálního karcinomu
- Stanovit biologický materiál, jeho specifikace, požadavky na odběr
- Popsat principy laboratorních technik užívaných k detekci kolorektálního karcinomu
- Příprava vzorků, provádění analýzy, seznámení s technikou pro stanovení kvantitativního testu okultního krvácení (qiFOBT), jeho vyhodnocení a vydávání výsledků

## **TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 Úvod

Kolorektální karcinom (CRC) je společný termín pro zhoubný nádor tlustého střeva a konečníku. Patří mezi nejčastější maligní onemocnění ve vyspělých státech světa. Podle mezinárodních dat o epidemiologii nádorových onemocnění, které jsou k dispozici ve výstupech Mezinárodní organizace pro výzkum karcinomu (IARC - International Agency for Research on Cancer, Lyon, France), zpřístupněných v databázi GLOBOCAN, zaujímá Česká republika, společně s Maďarskem a Slovenskem nepříznivé přední postavení v evropských statistikách počtu nově vzniklých případů a úmrtnosti na toto onemocnění. Incidence kolorektálního karcinomu u nás za posledních padesát let trvale stoupá. Mortalita se od poloviny devadesátých let v České republice již naštěstí nezvyšuje (Vyzula, Žaloudík et al., 2007).

Neustále rostoucí onkologická zátěž většiny ekonomicky vyspělých států nutí vlády i vedení zdravotnictví těchto zemí věnovat zhoubným nádorům patřičnou pozornost (Dušek et al., 2012). V Evropě i ve světě přibývá zemí, které stejně jako Česká republika zavádějí národní programy screeningu kolorektálního karcinomu (Seifert, 2012a). V České republice probíhá program screeningu kolorektálního karcinomu zaměřený na časnou diagnózu onemocnění od roku 2000.

Proces prevence maligních onemocnění je třístupňový. Úkolem primární prevence je omezení a odstranění příčin, které se obecně podílejí na vzniku nádorů. Vychází ze znalosti patogeneze onemocnění a epidemiologických poznatků. Sekundární prevence spočívá v aktivním vyhledávání bezpříznakových jedinců, kterým se dociluje včasný záchyt počínajících nádorových onemocnění. Úkolem terciární prevence je sledování pacientů s již rozvinutým nádorovým onemocněním a včasné odhalení recidivy či relapsu.

Cílem předkládané bakalářské práce je shrnutí dosavadních poznatků týkajících se možností včasného záchytu kolorektálního karcinomu se zaměřením na možnosti laboratorního screeningu. Součástí práce je rovněž shrnutí a srovnání screeningových programů v České republice a v zahraničí.

## **2 Problematika kolorektálního karcinomu**

Maligní choroby obecně nejsou řazeny mezi vzácná onemocnění. Nádory trávicího traktu, zejména pak kolorektální karcinom patří mezi nejčastější z nich.

Termínem kolorektální karcinom se označují nádorová onemocnění vznikající maligní transformací cylindrického epitelu tlustého střeva (vzestupný, příčný, sestupný tračník a esovitá klička) a rekta (Adam et al., 2010).

Buněčný cyklus je tvořen sledem vzájemně koordinovaných událostí. Může být narušen kancerogenními vlivy jak zevního, tak vnitřního prostředí. Jejich působením vznikají zprvu izolované nádorové buňky, které ještě dokáže zdravý organismus za vhodných podmínek likvidovat. V opačném případě se klon karcinomových buněk nekontrovaně dělí a roste.

Naprostá většina (80 %) kolorektálního karcinomu vzniká z přednádorových (premaligních) lézí v tlustém střevě, tzv. adenomových polypů (Suchánek et al., 2011). Přeměna normální sliznice tlustého střeva přes adenomový polyp v karcinom je spojena se získáním několika genetických změn, které mají za následek aktivaci onkogenů a inaktivaci tumor-supresorových genů. Kolorektální karcinom roste pomalu a maligní transformace trvá podle modelových studií v průměru 8-10 let (Musil, 2003).

Pro dlouhý časový interval potřebný k malignizaci adenomového polypu patří kolorektální karcinom mezi prevencí nejlépe ovlivnitelné a léčitelné nádory, pokud se zjísť v časném stadiu. Z těchto důvodů je tato choroba vhodná pro screening.

### **2.1 Určení rozsahu kolorektálního karcinomu**

Rozsah onemocnění je zásadním faktorem určujícím do značné míry nejen prognózu onemocnění, ale i výběr léčebných prostředků (Klener, 2011). Proto je jeho stanovení mimořádně důležité. Základním klasifikačním systémem závazným v ČR je klasifikace TNM doporučená UICC (Union Internationale Contre le Cancer).

TNM klasifikace slouží k jednoduchému popisu rozsahu nádoru a určení stadia onemocnění, kdy T (tumor) – popisuje rozsah nádoru, jeho velikost a vztah k okolním strukturám, N (noduli) – vymezuje rozsah postižení mízních uzlin a M (metastases) – udává přítomnost vzdálených metastáz. Kombinace T, N a M poskytují při klasifikaci onemocnění škálu možností (tab. 1).

Tab. 1 TNM klasifikace kolorektálního karcinomu (UICC 1997; Adam et al., 2010)

<b>T</b>	<b>Primární tumor.</b>
TX	Primární tumor nelze posoudit.
T0	Primární tumor neprokázán.
TIS	Carcinoma <i>in situ</i> .
T1	Tumor infiltruje submukózu.
T2	Tumor infiltruje muscularis propria.
T3	Tumor infiltruje muscularis propria a subserózu nebo neperitonealizovanou perikolickou nebo perirektální tkáň.
T4	Tumor infiltruje přímo do jiných orgánů a struktur nebo perforuje viscerální peritoneum; infiltrace jiných segmentů kolorekta přes serózu, př. infiltrace sigmatu karcinomem rekta.
<b>N</b>	<b>Regionální uzliny.</b>
NX	Nebyly provedeny předepsané metody pro vyšetření regionálních uzlin.
N0	Žádné regionální uzliny nejsou postižené.
N1	Metastatické postižení 1 - 3 regionálních uzlin.
N2	Metastatické postižení ve 4 nebo více regionálních uzlinách.
PN0	Provedená regionální lymfadenektomie s histologicky negativním vyšetřením více než 12 uzlin.
<b>M</b>	<b>Vzdálené metastázy.</b>
MX	Nebyla provedena vyšetření ke zjištění těchto metastáz.
M0	Žádné metastázy neprokázány.
M1	Vzdálené metastázy prokázány.

Pro snadnější klasifikaci se v odborné literatuře často také uvádí podle doporučení UICC dělení onemocnění do 4 stádií (I – IV) (tab. 2).

Tab. 2 Vzájemná korelace používané TNM klasifikace se stadii podle UICC

<b>Klinické dělení stadií CRC</b>				
Stadium 0		TIS	N0	M0
Stadium I		T1, T2	N0	M0
Stadium II	IIA	T3	N0	M0
	IIB	T4	N0	M0
Stadium III	IIIA	T1, T2	N1	M0
	IIIB	T3, T4	N1	M0
	IIIC	jakékoliv T	N2	M0
Stadium IV		všechny T	všechny N	M1

## **2.2 Epidemiologie kolorektálního karcinomu**

### **2.2.1 Incidence a mortalita v Evropě a ve světě**

V Evropě žije v současnosti kolem 3 milionů osob s CRC, což představuje zhruba 60 % světové prevalence (převahy) onemocnění (Seifert, 2012a). Roční incidence v Evropě přesahuje 400 000 nových případů a zhruba 200 000 osob na onemocnění CRC zemře. Nejvyšší absolutní počty nových případů jsou hlášeny z Německa, Ruska, Itálie; ČR, Slovensko, Německo a Maďarsko patří mezi evropské země s nejvyšším výskytem nádoru na počet obyvatel, nejnižší incidence se udává v Řecku, Rumunsku, Litvě, Lotyšsku a Finsku.

Na základě nejnovějších dat Mezinárodní organizace pro výzkum karcinomu (IARC), zveřejněných prostřednictvím databáze GLOBOCAN z roku 2012, byla česká populace ve výskytu kolorektálního karcinomu podle pohlaví v Evropě na čtvrtém místě u mužů a na šestnáctém místě u žen. V porovnání s rokem 2008, kdy v incidenci CRC u mužů zaujímal ČR třetí a u žen deváté místo, výskyt karcinomu kolorekta u mužů ve světovém srovnání stagnuje, u žen je patrné mírné zlepšení.

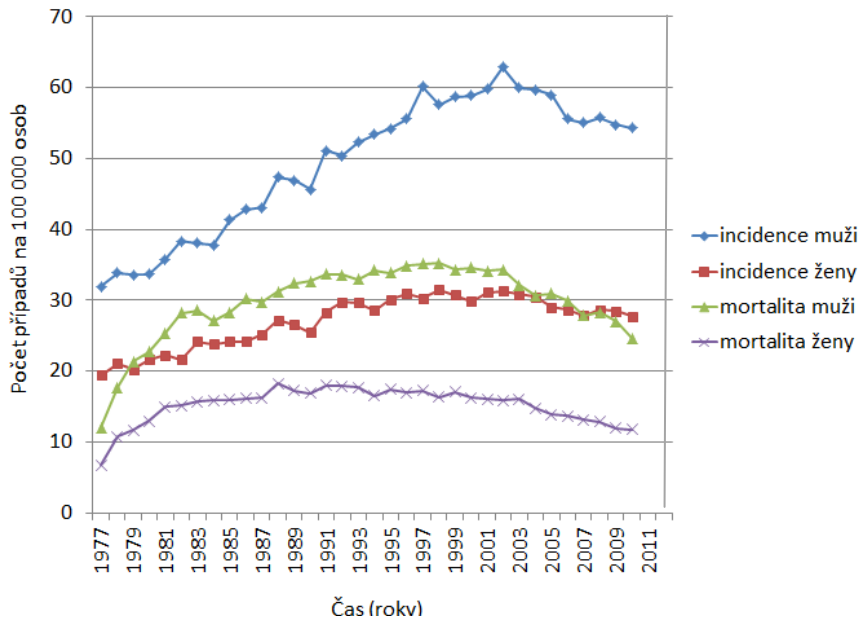
V USA je diagnostikováno 150 000 nových případů CRC ročně, zhruba 60 000 pacientů na CRC umírá (Seifert, 2012a). V Evropě a Japonsku je kolorektální karcinom častější u mužů, v USA je výskyt u obou pohlaví vyrovnaný.

### **2.2.2 Incidence a mortalita v České republice**

Hlavním zdrojem dat o epidemiologii zhoubných nádorů je Národní onkologický registr ČR (NOR) (Dušek et al., 2012). Dnes je NOR nedílnou součástí komplexní onkologické péče a při 100 % pokrytí české populace obsahuje za období 1977 - 2009 více než 1,7 milionu záznamů. Registrace novotvarů je legislativně zakotvena a je povinná (Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2012). Z tohoto počtu pak téměř 12 % záznamů představují zhoubné nádory tlustého střeva a konečníku. Široké veřejnosti jsou tato data přístupná na webovém portálu [www.svod.cz](http://www.svod.cz) (Dušek et al., 2012).

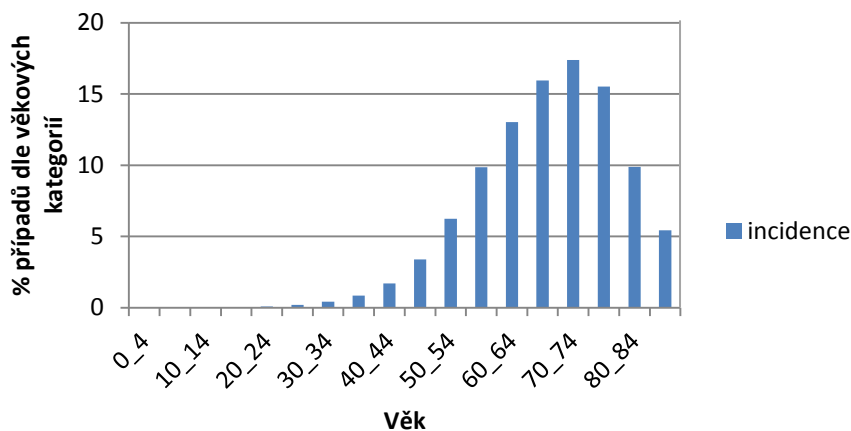
Kolorektální karcinom je na počátku 21. století v České republice nejčastějším nádorovým onemocněním obou pohlaví (Vyzula, Žaloudík et al., 2007). Populační zátěž je skutečně vysoká, ročně je v ČR diagnostikováno 7800 - 8100 pacientů s kolorektálním karcinomem a 3800 - 4200 pacientů na něj zemře (Dušek et al., 2012).

Od 70. let hrubá incidence výskytu CRC trvale stoupala. V posledních letech lze pozorovat náznaky zlepšení, především ve stabilizaci mortality, která začíná vykazovat i mírný pokles (Dušek et al., 2012) (obr. 1).



Obr. 1 Graf historického vývoje incidence a mortality CRC u obyvatel ČR (vytvořeno podle dat NOR)

Vysoký výskyt CRC má lékařské, etické a společenské důsledky. Jsou o to závažnější, že nemoc ve velké míře postihuje pacienty v produktivním věku (Dušek, 2012). Typický věk českého pacienta s kolorektálním karcinomem sice leží v intervalu 61 - 77 let, ale 21 % všech nemocných je mladších 60 let (obr. 2).



Obr. 2 Graf věkové struktury pacientů ČR (vytvořeno podle dat NOR)

Závažnou skutečností je, že rostoucí léčebnou zátěž do značné míry představují pacienti s pokročilým stadiem onemocnění (Dušek, 2012). Nedostatečná prevence a pozdní záchyt CRC si tak vybírají svou daň v léčebných nákladech a samozřejmě také v nižší naději na léčebný úspěch.

V pozdních stadiích III a IV je zachyceno celkem 45 % nádorů u mužů a 47 % nádorů u žen, což je situace velmi nepříznivá. (Holubec et al., 2004) (tab. 3).

Tab. 3 Záchyt CRC v České republice podle stadií onemocnění a podle pohlaví (podle Holubec et al., 2004)

Stadium	Záchyt kolorektálního karcinomu			
	Muži		Ženy	
I	33 %	55 %	34 %	53 %
II	22 %		19 %	
III	16 %	<b>45 %</b>	20 %	<b>47 %</b>
IV	29 %		27 %	

## 2.3 Etiologické faktory CRC

Vznik kolorektálního karcinomu nemá jedinou příčinu, ale je ovlivněn vzájemným působením vnějších faktorů, dědičných předpokladů a dalších vlivů.

Především genetické predispozice, včas zjištěné pozitivní rodinnou anamnézou, případně další predisponující vlivy, následně řadí jedince do rizikové skupiny obyvatel s nutností intenzivní dispenzarizace.

### 2.3.1 Vliv vnějších faktorů

Mezi vnější rizikové faktory CRC patří strava s vysokým obsahem živočišných tuků a červeného masa, nízký obsah vlákniny ve stravě, nadváha, konzumace alkoholu, nedostatečný příjem protektivních látek např. vitamínu C, listové kyseliny (Vyzula, Žaloudík et al., 2007). Také nevhodně tepelně upravované (grilované, smažené, uzené) živočišné proteiny vedou k významnému množství látek s potencionálně karcinogenním působením (Seifert, 2012b). Specifickým rysem výživových faktorů je mimořádná míra jejich účinku v organismu. Nízký obsah vlákniny a nadměrná konzumace sacharidů navíc zpomalují průchod obsahu střevem a jsou příčinou delší expozice střevní stěny možným karcinogenům.



Mezi exogenními faktory kolorektálního karcinomu je v odborné literatuře uváděn rovněž profesionální kontakt s chemickými látkami typu těžkých kovů, azbestu, chlorovaných uhlovodíků, dále kouření, dlouhodobý stres a snížená fyzická aktivita.

### **2.3.2 Vliv dědičných faktorů**

U části populace lze pozorovat výraznou dědičnou predispozici ke vzniku kolorektálního karcinomu.

Kolem 20 - 25 % případů kolorektálního nádoru je řazeno mezi familiární formy (Vyzula, Žaloudík et al., 2007).

Termínem familiárně podmíněné tumory označujeme ty případy, kdy je zřetelný vyšší výskyt karcinomu v rodině, ale není prokazatelná definovaná genetická informace (Adam et al., 2010). Epidemiologické studie prokázaly, že příímí příbuzní nemocných mají ve srovnání s ostatní populací 3 - 4krát vyšší pravděpodobnost také onemocnět kolorektálním karcinomem.

U 5 - 10 % pacientů lze pozorovat výraznou dědičnou (hereditární) predispozici ke vzniku nádoru (Vyzula, Žaloudík et al., 2007).

Termínem hereditární karcinomy označujeme ty případy, kdy je známá genetická abnormalita vedoucí k jejich vzniku a je dostupnými metodami diagnostikovatelná a to jak u nemocných, tak u příbuzných, kteří jsou nositeli této rizikové genetické informace (Adam et al., 2010). Mezi geneticky podmíněné kolorektální karcinomy patří hereditární nepolypózní karcinom (Lynchův syndrom), syndrom familiární polypózy tlustého střeva, Gardnerův syndrom, Turkotův syndrom a syndrom plochých adenomů.

### **2.3.3 Predisponující vlivy**

Za predisponující změny jsou považovány dysplazické léze a chronické záněty střeva - ulcerózní kolitida a Crohnova choroba (Holubec et al., 2004). Prekancerózní změnou je u těchto chorob dysplazie, která často předchází vzniku kolorektálního karcinomu.

Z dostupných epidemiologických dat vyplývá, že rizikovou skupinou pro vznik CRC jsou osoby nad padesát let. K predisponujícím vlivům karcinomu kolorekta je proto řazen i vyšší věk.

## 3 Geneze a klinický obraz kolorektálního karcinomu

### 3.1 Iniciace onemocnění CRC

Nejčastěji, asi v 80 % případů kolorektálního karcinomu, se vyskytuje, tzv. sporadický karcinom, který nemá ani familiární ani hereditární charakter. Většina sporadických karcinomů vzniká z adenomových polypů, které jsou významnou prekancerózou.

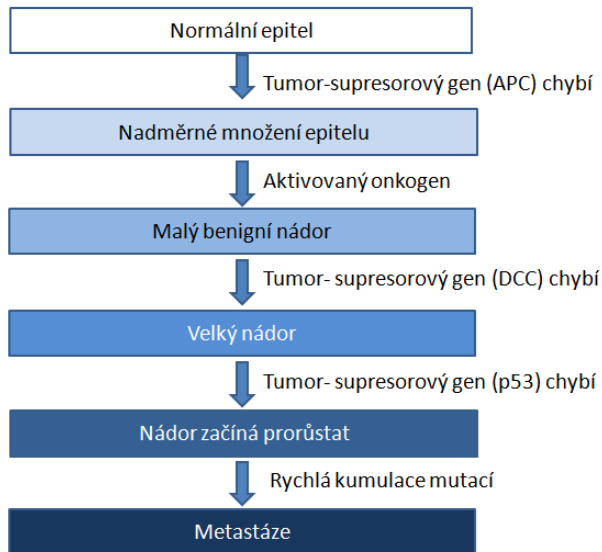
Sporadická forma kolorektálního karcinomu se vyznačuje kompletním vyřazením obou alel důležitého genu z funkce, nicméně k této změně je třeba ještě dalších dvou mutací v somatické buňce (Holubec et al., 2004). Pravděpodobnost tohoto jevu je poměrně malá a takto způsobené nádory vznikají ve vyšším věku. Naproti tomu při hereditární formě kolorektálního karcinomu je zárodečná mutace přítomna ve všech buňkách jedince. U hereditární formy nádorového onemocnění tak stačí k vyřazení genu pouze jediná mutace somatické buňky. Oproti sporadické formě kolorektálního karcinomu je proto u hereditárních forem riziko malignizace mnohem vyšší, pravděpodobnost takové mutace je vysoká a posouvá se do mladších věkových kategorií.

Základem karcinomu je nádorová buňka. Ta vzniká z normální buňky procesem zvaným kancerogeneze. K přeměně normální buňky na nádorovou je třeba sled nezávislých mutací, které se musí odehrát v jediné buňce, aby získala všechny potřebné vlastnosti.

Tumor supresorové geny (antionkogeny), respektive jejich proteinové produkty, kontrolují normální buněčnou proliferaci a diferenciaci (Holubec et al., 2004). Jde především o gen p53, APC gen a DCC gen.

Aby tumor začal invalidovat, musí dojít ke změnám, které umožní buňce dostat se přes bazální membránu epitelu do podložní tkáně, usadit se a přežít na nových místech (Alberts et al., 1998). Posloupnost událostí začíná ztrátou APC (*Adenomatosis polyposis coli*), tumor-supresorového genu na mnoha nezávislých místech tlustého střeva. Ztráta APC iniciuje růst benigního nádoru nazývaného polyp, z kterého po několika dalších mutacích vzniká maligní nádor (obr. 3).

Epiteliální kmenová buňka ve výstelce střeva prochází změnami, které iniciují její častější dělení. Nově vzniklé buňky mají navíc schopnost uniknout programované buněčné smrti a vytvoří si krevní zásobení dostačující pro pokračující nádorový růst.



Obr. 3 Progrese nádoru při akumulaci mutací (vytvořeno podle Alberts, 1998)

Inaktivující mutace v genu APC iniciují proces tvorby nádoru tím, že způsobují vývoj abnormálních tkání ve střevním epitelu. (Snustad, Simmons, 2009). Tyto abnormální tkáně obsahují dysplazické buňky, které mohou tvořit časně adenomy (polypy). Pokud je v jednom z těchto adenomů aktivován protoonkogen K-ras, může takový adenom dále růst a vyvíjet se. Inaktivující mutace v kterémkoliv z několika nádorových supresorových genů, které se nacházejí na dlouhém rameni chromozomu 18, mohou způsobit, že se adenomy dále vyvíjejí a inaktivující mutace v nádorovém supresorovém genu TP53 na chromozomu 17 je mohou transformovat v intenzivně rostoucí karcinomy. Další mutace nádorových supresorových genů mohou způsobit, že se rakovinné buňky uvolní z primárního nádoru a napadají další tkáně. Takže nejméně sedm nezávislých mutací je nutných k vývoji karcinomu střeva a pravděpodobně ještě další mutace jsou nutné k tomu, aby karcinom tvořil metastázy v dalších částech těla (obr. 4).

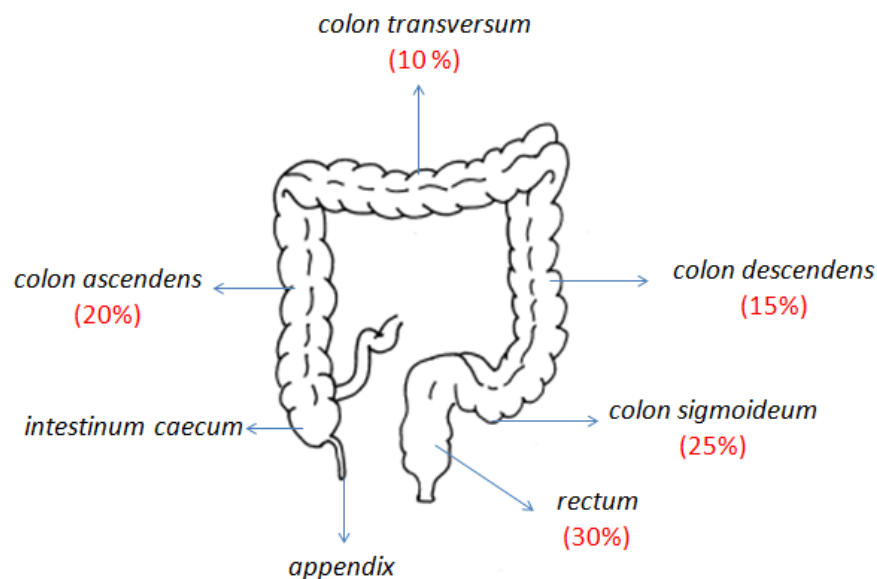


Obr.4 Postupná přeměna normálního epitelu na invazivní nádorové bujení [cit. 2014-15-01].  
Převzato z: <http://www.rakovinastreva.cz/data/images/streva2.jpg>

### 3.2 Klinický obraz CRC

Tlusté střevo (*intestinum crassum*) je konečným úsekem trávicí trubice. Hlavní funkcí tlustého střeva je vstřebávání vody, minerálů a vitamínů. Hromadí se v něm nestrávené zbytky potravy, promíchává se střevní obsah a formuje stolice.

Klinické projevy a důsledky karcinomu kolorekta závisí na jeho lokalizaci, rozsahu a stadiu onemocnění. Kolorektální karcinom se nejčastěji vyskytuje v oblasti rektosigmoidea, nejmenší procento lokalizací CRC se nachází v colon transversum (obr. 5).



Obr. 5 Stavba kolorekta s procentuálním rozložením výskytu CRC (zdroj dat: Seifert, 2012a)

Příznačnými akutními komplikacemi jsou obstrukce a perforace střeva. Pravostranný CRC vede často ke krvácení a ztrátové anémii. Onemocnění v této části střeva se diagnostikuje poměrně obtížně, neboť příznak přítomnosti krve ve stolici nebývá vizuálně patrný. Zjištěná anémie je proto často jediným ukazatelem možného probíhajícího onemocnění. Příznakem postižení levé poloviny střeva bývá navíc zácpa, ileus a také možné bolestivé stavy. Tumor v rektální oblasti se projevuje přítomností krve a hlenu ve stolici a tenezmy.

Odchod krve a hlenů trvá někdy řadu měsíců (Holubec et al., 2004). Krev nemocný často přisuzuje krvácení z hemoroidů. Krev může nebo nemusí být smíšená se stolicí. Po stolici zůstává pocit nedostatečného vyprázdnění. Při odchodu plynů může

nechtěně odejít i stolice. Bolest u tumoru v ampule rektální bývá pozdním příznakem. Pozdní je i hubnutí.

K méně obvyklým příznakům patří hluboká žilní trombóza, proteinurie, bakteriemie. (Novotný et al., 2012). Při generalizaci do jater se setkáváme s bolestí, hepatomegalií a žloutenkou. Malé nádory jsou obvykle asymptomatické.

## **4 Diagnostika a screening kolorektálního karcinomu**

Úkolem sekundární prevence je záchyt a ovlivňování již vzniklého onemocnění v léčitelném stadiu formou preventivních prohlídek, masového screeningu a včasné diagnostiky onemocnění.

Sekundární prevence zahrnuje dvě pracovní metody (Frič et al., 2007):

- screening (depistáž) – tj. časná diagnostika choroby, pokud možno u bezpříznakových jedinců
- dispenzarizaci (follow-up, surveillance) – tj. dlouhodobé sledování vysokorizikových skupin

Před zahájením léčby zjišťujeme anamnézu, zaměřujeme se na rodinný výskyt onemocnění, výskyt polypů či jiných malignit (Adam et al., 2010). Diagnózu karcinomu tlustého střeva lze stanovit endoskopickým vyšetřením této části trávicí trubice (rektoskopií, sigmoideoskopií, kolonoskopií), které umožňuje snesení polypů nebo vzorků z nejasně změněných tkání a jejich histologické vyšetření. Alternativou endoskopie je rentgenologické vyšetření s aplikací kontrastní látky a vzduchu – metoda dvojího kontrastu.

K základnímu vyšetření sloužícímu k zjištění rozsahu a lokalizaci nádoru patří ultrazvukové vyšetření břicha a následné vyšetření pomocí počítačové tomografie (CT) nebo prostřednictvím magnetické rezonance (MRI).

V depistážním programu pro včasnou diagnostiku CRC hraje podstatnou roli screening (Holubec et al., 2004).

Světová zdravotnická organizace (WHO) stanovila pro screening obecná pravidla: (Gnauck, 1980)

- choroba je léčitelná a má závažné důsledky, pokud léčena není, nebo je léčba pozdní
- úvodní metoda je jednoduchá, levná, přijatelná pro probanda i poskytovatele
- pokud jde o nepřímou metodu, má dávat málo falešně pozitivních výsledků

- rozhodující kritérium pro populační screening je snížení mortality na sledovanou chorobu v prospektivní randomizované studii

Včasné zjištění a zahájení léčby CRC výrazně zlepšuje celkovou prognózu. Screening onemocnění představuje soustavné vyšetřování potencionálně zdravých osob za účelem vyhledání jedinců s již probíhající nemocí. Úspěšně prováděný screening tak vede nejen k efektivnější léčbě, ale má i nezanedbatelné ekonomické a sociální důsledky. Vzhledem k četnosti onemocnění v populaci je screening kolorektálního karcinomu významným prostředkem boje s touto nemocí v různých částech světa.

#### **4.1 Situace v Evropě a ve světě**

The American Cancer Society (ACS) vydala roku 2004 doporučení pro preventivní kontroly u bezpříznakových jedinců s průměrným rizikem. Jako populační skupinu pro screening CRC doporučila muže a ženy starší 50 let, jako screeningové metody pak testy na okultní krvácení, flexibilní sigmoideoskopii, dvoukontrastní irigoskopii, nebo kolonoskopii. Z hlediska časového je podle doporučení ACS jednou z možností screeningu vyšetření na okultní krvácení v intervalu 1 roku, v 5letých intervalech doplněné sigmoideoskopií, druhou dvoukontrastní irigoskopie v intervalu 5-10 let, třetí kolonoskopie v intervalu 10 let.

V celosvětovém měřítku je nejčastěji používán dvouetapový screeningový program FOBT – kolonoskopie. Byl doporučen sborem nezávislých expertů v USA (US Preventive Services Task Force) v 1995 a v Evropě (European Group for Colorectal Cancer Screening) v roce 1998.

Sousední státy České republiky, Německo, zvláště spolková země Bavorsko, Slovensko a Rakousko, sdílí s ostatními zeměmi střední Evropy úděl nejtěžší zátěže morbiditou a mortalitou onemocnění kolorektálním karcinomem. Německo se pohybuje na desáté příčce v evropských tabulkách incidence a mortality mužů a žen na kolorektální karcinom (Herzog, J. et al, 2013).

V Německu jako první zemi byl deklarován screeningový program již v roce 1976, v České republice jako druhé zemi celosvětově o 24 let později. V posledních letech nastal ve screeningu celosvětově ohromný rozmach. Ročně jsou publikovány desítky studií a screeningové programy rozvíjí většina vyspělých zemí (Špičák, Kovářová, 2012).

Od roku 2002 existuje v Německu strategie zaměřená na prevenci kolorektálního karcinomu, která je dobře dostupná v rámci zákonného zdravotního pojištění (Herzog, J. et al., 2013). Základ této strategie představuje guajakový test na okultní krvácení ve stolici, běžně užívaný od roku 1977, a kolonoskopie, zlatý standard screeningu. Obě metody přispěly k tomu, že incidence i mortalita pomalu klesají.

K novým metodám, které mohou zvýšit senzitivitu vyšetření CRC, patří v Německu, stejně jako v ČR, v současnosti imunochemické testy na okultní krvácení.

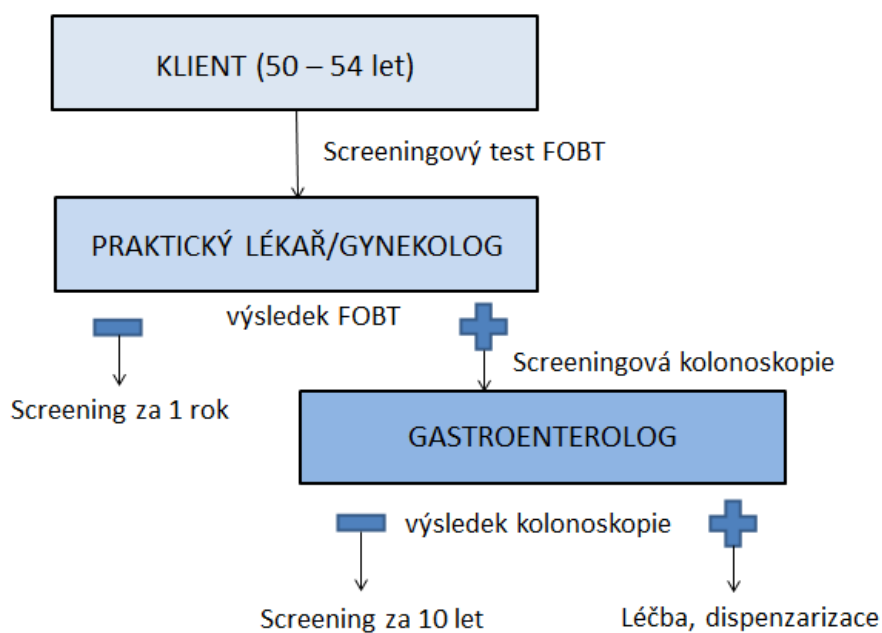
## **4.2 Situace v České republice**

Populační screening sporadického kolorektálního karcinomu v České republice byl zahájen 1. 7. 2000. Vyšetření zahrnuje test na okultní krvácení do stolice (FOBT), nově se mohou klienti rozhodnout i pro primární screeningovou kolonoskopii (Zavoral et al., 2013).

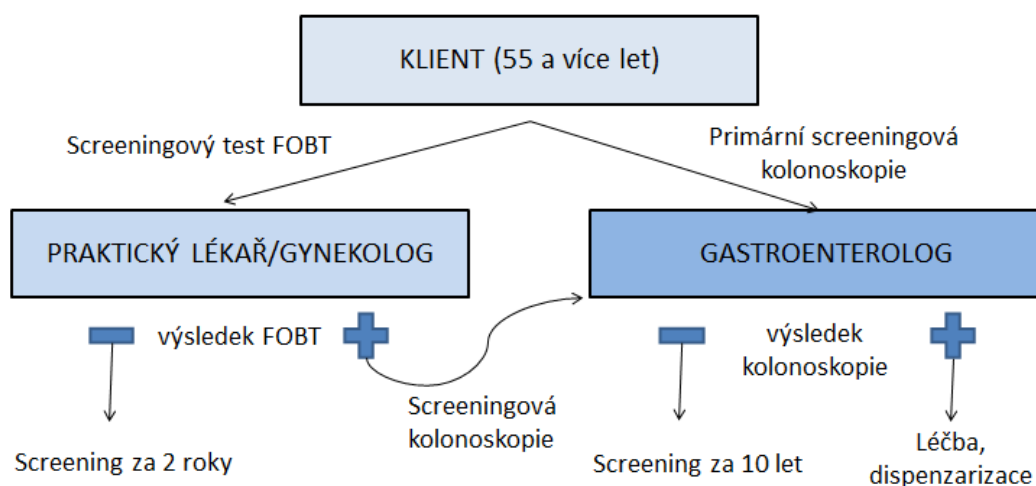
V současné době probíhá program na několika desítkách pracovišť. Od roku 2009 byla vybudována celostátní síť endoskopických pracovišť (Centra pro screeningové kolonoskopie), která splňují přísná pravidla kvality pro provádění preventivních kolonoskopií. Základem programu je screeningové vyšetření, které může podstoupit každý asymptomatický jedinec starší 50 let bez pozitivní rodinné či osobní anamnézy rizika onemocnění CRC. Pro tyto osoby platí postup, který je v ČR podle věku odstupňován do dvou etap. Jednotlivé kroky tohoto screeningu znázorňují schematicky obrázky 6 a 7. Pro rizikové osoby jsou určeny speciální postupy, lišící se podle stupně rizika.

Nejbližší budoucnost programu screeningu CRC lze shrnout do těchto bodů (Zavoral et al., 2013):

- utlumení guajakových testů na okultní krvácení a přechod na modernější testy imunochemické (nastalo během roku 2013)
- zavedení institutu adresného zvaní, celorepublikový projekt spojený s mediální kampaní (bylo zahájeno v polovině roku 2013)
- zavedení screeningové odbornosti pro výkony v rámci screeningu kolorektálního karcinomu
- udržení kvality prováděných preventivních kolonoskopií, reakreditace Center pro screeningovou kolonoskopii.



Obr. 6 Schéma postupu u asymptomatických jedinců ve věku 50 - 54 let



Obr. 7 Schéma postupu u asymptomatických jedinců ve věku 55 a více let



### **4.3 Screeningová kolonoskopie**

Kolonoskopie splňuje účel diagnostický (zjištění nebo vyloučení zdroje krvácení v kolorektu), ale zároveň má velký význam profylaktický, který spočívá v odstranění polypů metodou endoskopické polypektomie (EPE) (Zavoral et al., 2013).

V České republice je v rámci screeningu kolorektálního karcinomu kolonoskopie doporučována při pozitivním výsledku testu FOBT. O primární screeningovou kolonoskopii mohou také požádat lidé starší 55 let. Pokud je výsledek vyšetření negativní, stačí kolonoskopii opakovat v intervalu deseti let. V případě positivity je další postup stanoven gastroenterologem rovněž na základě histologie odebraného vzorku při endoskopickém vyšetření. Screeningová kolonoskopie se v ČR provádí na speciálních pracovištích akreditovaných Ministerstvem zdravotnictví ČR (MZČR) pro provádění screeningového programu kolorektálního karcinomu.

Kolonoskopie je vyšetření invazivní. Spočívá ve vyšetření konečníku a tlustého střeva moderním flexibilním videoendoskopem. Obraz z optiky přístroje je přenášen na plochu monitoru a umožňuje detailní analýzu vyšetřovaného orgánu. V ohebné hadici přístroje jsou kromě optických vláken a světlovodu se studeným zdrojem světla rovněž vedeny kanály pro oplachování optiky a sliznice, odsávání přebytečných tekutin i vzduchu, zavádění nástrojů, případně odběr vzorků sliznice. Sliznice střeva je k těmto výkonům zcela necitlivá. Výkon je z důvodu zklidnění pacienta obvykle prováděn v lehké sedaci, pokud nejsou předpokládány komplikace, probíhá bez nutnosti hospitalizace.

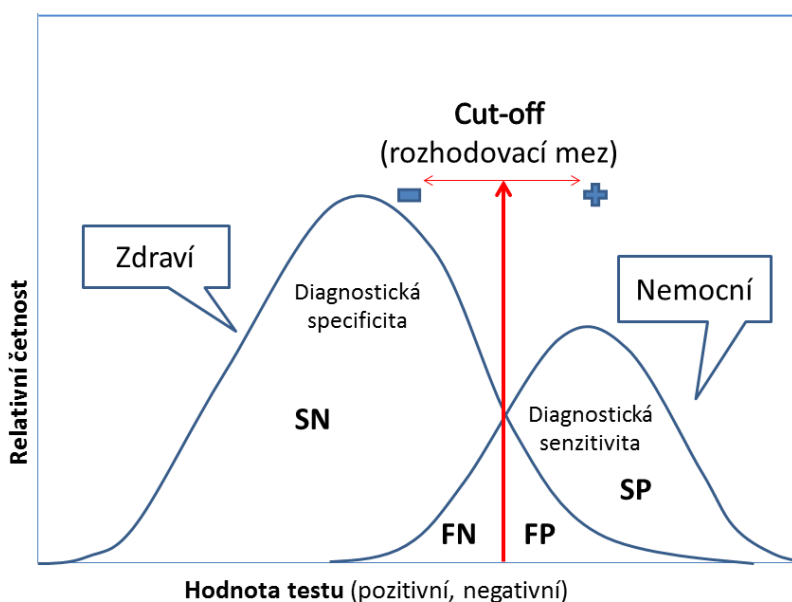
V budoucnu by se mohla stát metodou volby kapslová endoskopie, pokud se v prospektivních randomizovaných studiích potvrdí její rovnocennost s kolonoskopií. (Herzog et al., 2013 & Sieg, 2011). Kapslová endoskopie je i v České republice jako neinvazivní metoda ve stadiu testování pro použití ve screeningu (Seifert, 2012b).

### **4.4 Možnosti laboratorního screeningu**

Základním testem screeningových programů CRC v Evropě i ve světě je test okultního krvácení do stolice FOBT (Feccal Occult Blood Test). Význam těchto testů neustále roste, jsou zaváděny nové, stále citlivější a specifitější testy, které se podílejí na stanovení diagnózy a prognózy onemocnění a mohou být úspěšně využity i při určování a sledování léčby. Podle Švestky (2013) je pro účely screeningu zásadní otázkou správné nastavení jejich parametrů. Cílem je vybrat takové testy, které s nejmenším

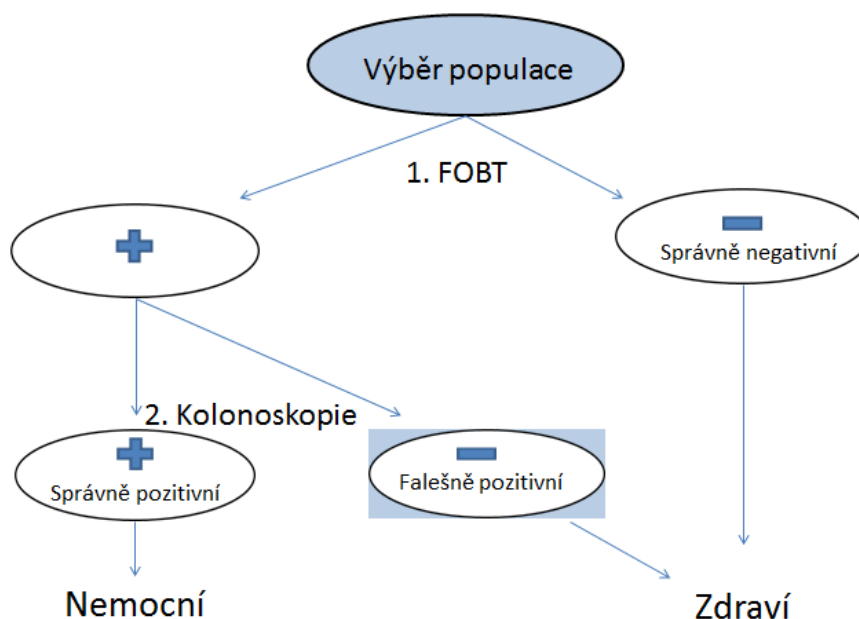
rizikem a náklady vyberou z cílové populace osoby, u nichž je vyšší pravděpodobnost záchytu nálezu; tedy testy s nízkou falešnou pozitivitou (více specifické) i falešnou negativitou (více senzitivní).

Diagnostická senzitivita se týká populace nemocných, zatímco diagnostická specifita charakterizuje schopnost testu určit zdravé jedince. V laboratorním screeningu CRC je však vyšetřována populace smíšená, tvořená zdravými i nemocnými osobami, proto nelze tyto jmenované parametry laboratorní metody nikdy oddělit. Výsledky populace zdravých a nemocných jedinců se do určité míry překrývají. U části zdravých poskytuje metoda falešně pozitivní výsledky a u části nemocných najdeme výsledky falešně negativní. Rozhodující pro poměr diagnostické senzitivity a specifity je určení takové hodnoty testu, od které bude výsledek testu považován za pozitivní (tzv. "cut-off") (obr. 8).



Obr. 8 Diagnostická specifita a senzitivita, stanovení rozhodovací meze cut-off (SN – správně negativní, FN – falešně negativní, SP – správně pozitivní, FP – falešně pozitivní) (podle Racek et al., 2006)

Podle Racka (2006) je malá míra nespecifity možná; jedinci s falešně pozitivním výsledkem jsou vyloučeni užitím specifického testu v druhém kole vyšetřování. V případě kolorektálního karcinomu je falešná pozitivita řešena následným doporučením kolonoskopie (obr. 9).



Obr. 9 Hodnocení výsledků z hlediska použití screeningových metod CRC (1. test s důrazem na diagnostickou senzitivitu, 2. test s důrazem na diagnostickou specificitu)

Testy FOBT jsou založeny na principu detekce krvácení do stolice. Krevní ztráty však mohou být i fyziologické. U dospělého člověka dochází denně ke ztrátám krve stolicí v objemu 0,5 - 2,5 ml (Kocna 2011, Seifert, 2012b). Pokud toto množství krve vztáhneme na koncentraci hemoglobinu v krvi (120 - 150 mg/ml) a množství stolice za 24 hodin (300 – 450 g), pak můžeme hodnoty 0,3 - 1,3 mg hemoglobinu na 1 g stolice považovat za fyziologické rozmezí. Z toho vyplývá, že testy na okultní krvácení by měly být nastaveny tak, aby tuto koncentraci nedetekovaly jako pozitivní nález ve stolici.

Testy na detekci okultního krvácení jsou vyvíjeny téměř padesát let a lze proto charakterizovat již tři generace FOB testů (Kocna, 2011).

#### 4.4.1 Testy 1. generace gFOBT

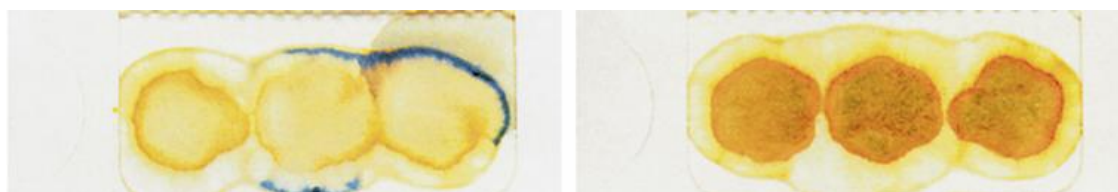
První generaci FOBT testů představuje gFOBT (Guaiac Feccal Occult Blood Test). Je založen na pseudoperoxidázové reakci hemoglobinu s guajakovou pryskyřicí (Schneiderka et al., 2004). Bezbarvá leukoforma se v přítomnosti hemoglobinu oxiduje peroxidem vodíku na barevnou (chromogenní) formu. Vzhledem k chemickému principu oxidační reakce může být výsledek testu ovlivněn přítomností jiných oxidačních látek (vitamín C), přítomností hemoglobinu z potravy (maso, krev), falešně

pozitivní výsledek může být způsoben i přítomností rostlinných peroxidáz (některé druhy kořenové zeleniny).

Reakce vyžaduje uvolnění hemoglobinu z červených krvinek, tj. s natrávenou buněčnou membránou (Seifert, 2012b). K tomu dochází v trávicí trubici účinkem enzymů trávicích bílkoviny (proteolytické enzymy). Není proto správné provádět reakci v čerstvé krvi, a proto je také citlivost testu nižší při afekcích konečníku. Naproti tomu při krvácení do horní části trávicího traktu bývá krevní barvivo (pokud není krvácení těžké) účinkem trávicích enzymů střevního obsahu již natolik změněno, že ztrácí svou schopnost přenášet kyslík. Proto pozitivitu testu způsobuje jen výrazné krvácení do horní části trávicí trubice.

Pro screening v ČR byla ještě nedávno dodávána souprava (Haemoocult), která obsahuje tři testy se dvěma okénky a plastové nebo dřevěné špátle na odběr stolice. Pacientem byly odebrány vždy dva různé vzorky ze tří po sobě následujících stolicí, rozetřeny na označená místa testu, testovací okénka uzavřena a testy byly následně odeslány do laboratoře. Laboratorní zpracování spočívalo v aplikaci detekčního reagensu na opačnou stranu okének a zhodnocení případné barevné změny.

Jsou známé guajakové testy (Haemoccult, HemDetect, TriSlide, HemoCare, ColoScreen, Hema-Check a další) od řady firem. Hodnocení je u všech gFOBT kvalitativní, jako pozitivní je hodnocen každý test, kde dochází ke specifickému modrozelenému zbarvení (obr. 10).

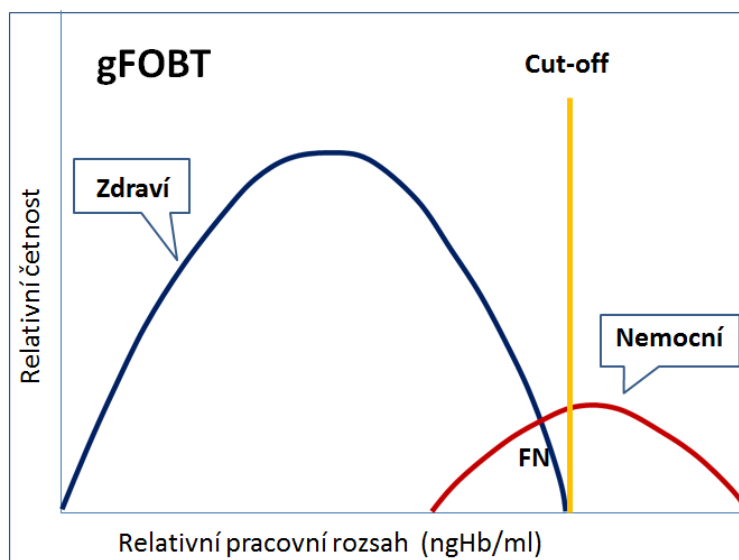


Obr. 10 Pseudoperoxidázová reakce hemoglobinu s guajakovou pryskyřicí na barevnou formu - pozitivní test vlevo a negativní test bez reakce vpravo - (guajakový test HemoCare) [cit. 2014-04-02]. Převzato z: <http://testery.mabonex.sk/wp-content/uploads/Test-hemoCARE-vysledok.png>

Nevýhod guajakového testu je několik. Test vyžaduje před jeho provedením specifickou dietu k vyloučení výše uvedených látek, jež by výsledek testu mohly ovlivnit. Další nevýhodou je opakovaný způsob odběru, při kterém vyšetřovaná osoba pomocí špátle manipuluje se stolicí. Úskalí mohou nastat také v analytické části metody gFOBT. Odebrané vzorky stolice je třeba při zajištění podmínek, jako je zamezení

slunečního světla a zachování teploty do 25°C, dopravit do ordinace, či laboratoře k vyhodnocení. Vlastní detekční reakce musí být provedena provedena do 48 hodin od posledního odběru za dodržení metodického postupu, který má zamezit riziku falešné interpretace výsledku. Samotná reakce po aplikaci několika kapek peroxidu vodíku je vizuálně vyhodnocena v době od třiceti do šedesáti sekund po aplikaci reagens. Případné modravé zbarvení je přechodné a postupně se ztrácí. Zelenomodrou barevnou změnu, která se objeví po několika minutách, již nelze hodnotit jako pozitivní nález okultního krvácení, tato je způsobená oxidací guajakové pryskyřice slunečním světlem.

Parametry gFOBT vykazují podle Špičáka (2012) nízkou citlivost zejména pro záchyt adenomů. U gFOBT nelze nastavit cut-off, tj. hodnotu koncentrace hemoglobinu, při které je již vzorek považován za pozitivní (Seifert, 2012b). Podle Kocny (2011) je senzitivita gFOBT testů první generace velmi nízká, pro detekci karcinomu do 30 %, jejich specificita přesahuje 90 %. Metoda gFOBT se vyznačuje takřka nulovou falešnou pozitivitou, ale vzhledem k nízké senzitivitě vykazuje vyšší procento falešně negativních výsledků (obr. 11). Výsledky jsou z důvodu krátkého času k analýze, či při slabě pozitivní reakci a vlastního hodnocení pouhým okem rovněž značně zatíženy subjektivismem.



Obr. 11 gFOBT vykazovaly nízkou senzitivitu a proto vyšší procento falešné negativity

Vzhledem k nízké senzitivitě guajakové testy ovlivnily incidenci CRC jen nevýznamně. Toto vyšetření navíc vyžadovalo pro pacienty před vyšetřením několikadenní stravovací omezení. Pro výše uvedené parametry se guajakové testy pro

screening kolorektálního karcinomu v České republice od počátku roku 2013 již nepoužívají.

#### 4.4.2 Testy 2. generace iFOBT

Imunochemický test iFOBT (Immunochemical Faecal Occult Blood Test), někdy též uváděný jako test FIT (Fecal Immunochemical Test) je citlivý test, který je určen k vyloučení krvácení do GIT (Schneiderka, 2004). Je založen na imunochemické detekci hemoglobinu reakcí s monoklonální protilátkou proti lidskému hemoglobinu.

Senzitivita a pozitivní průkaz je výrazně ovlivněn rozdílnou degradací obou složek hemoglobinu s ohledem na proximodistální gradient v trávicím ústrojí (Kocna, 2011). Globin je degradován mnohem rychleji, a pozitivita imunochemických testů téměř eliminuje detekci krvácení v horní části trávicí trubice. Degradace hemu je výrazně pomalejší. Detekce proteinů (lidského hemoglobinu) monoklonální protilátkou vylučuje možnost ovlivnění jiným zdrojem hemoglobinu (potrava), odpadá interference chemických látek, není nutná speciální dieta.

Parametry jednotlivých imunochemických testů se značně liší, nevýhodou je jejich nedostatečná standardizace. Otázkou při používání iFOBT v České republice tedy zůstává problematika jejich sjednocení, zvláště pak jednotné nastavení cut-off hodnoty tak, aby bylo možné pravidelné opakování testů při stejných parametrech použité metody. (tab. 4).

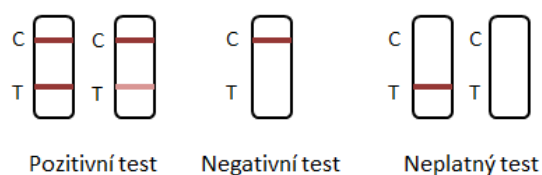
Tab. 4 Srovnání různých imunochemických kvalitativních testů s guajakovým Haemoccult provedené ve VFN Praha (podle Kocna, 2011)

Generace testu	Název testu (iFOBT x gFOBT)	Výrobce	Nastavená citlivost	Senzitivita	Falešná pozitivita
2.	Hemolex (iFOBT)	Orion Diagnostica	1 mg Hb/g stolice	48,6 %	10,0 %
2.	Actim Fecal Blood (iFOBT)	Medix Biochemica	25 – 50 µg Hb/g stolice	55,7 %	6,4 %
2.	Hexagon OBTI (iFOBT)	Human GmbH	25 – 50 µg Hb/g stolice	68,4 %	11,5 %
2.	HemeSelect (iFOBT)	Smith-Kline Diagnostica	10 µg Hb/g stolice	49,3 %	27,6 %
1.	Haemoccult (gFOBT)	Beckman Coulter	5-10 mg Hb/g stolice	<b>28,7 %</b>	<b>téměř 0 %</b>

Imunochemické testy se liší podle typu použité techniky (Kocna, 2011). Nejrozšířenější varianta imunochemického testu je založena na základě imunoafinitní chromatografie, kdy test obsahuje kombinaci dvou monoklonálních protilátek potřebných k selektivní detekci lidského hemoglobinu.

Vlastní provedení testu spočívá v odebrání vzorku z několika míst stolice pomocí tyčinky umístěné ve víčku lahvičky naplněné stabilizujícím roztokem. Po odběru je tyčinka s odebraným vzorkem stolice zasunuta zpět do lahvičky. Po aplikaci kapky vzniklého extraktu dochází k jeho postupnému vzlínání po sorbentu (testu). Při migraci jsou složky vzorku postupně separovány. Nanesený komplex vzlíná do testovací zóny (T). V případě, že vzorek obsahuje lidský hemoglobin, dochází k tvorbě červeně zbarveného proužku v této zóně jako indikátoru pozitivní reakce. Pokud vzorek neobsahuje lidský hemoglobin, nebo je přítomen v nižší koncentraci, než je nastavená citlivost, červený proužek se neobjeví a výsledek je negativní. Kontrolní proužek (C) potvrzuje funkčnost testovací soupravy a je zárukou, že vzorek prošel správně přes membránu. Hodnocení iFOBT testu je zásadně kvalitativní, a předpokládá definovanou cut-off hodnotu positivity testu.

Vyhodnocení iFOBT spočívá v odečtení přítomnosti barevného proužku, případně barevných proužků. Pokud reaguje pouze protilátka s barevným markerem v kontrolní zóně (C), objeví se jeden proužek a test je hodnocen jako negativní. V případě vzniku komplexu antigen-protilátka se v testovací zóně (T) objeví druhý proužek indikující přítomnost hemoglobinu ve stolici. Dva barevné proužky tedy určují pozitivitu testu (obr. 12).

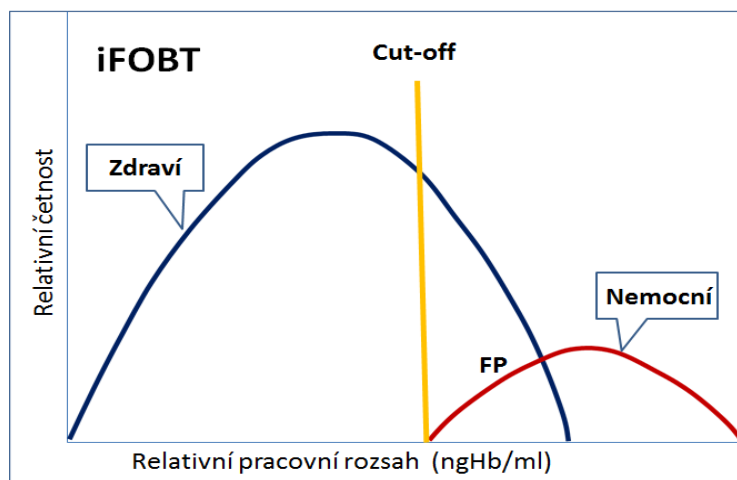


Obr. 12 Vyhodnocení imunochemické reakce - pozitivní test vlevo, negativní test (bez reakce antigen-protilátka) uprostřed a neplatný test vpravo

K iFOBT založeným na principu imunoafinitní chromatografie patří například testy ImmoCare, FOB test Dialab, Hexagon OBTI, Actim test. Techniku reverzní pasivní hemaglutinace využívá test Heme-Select a k imunochemickým testům je řazen i latexový test Hemolex (Schneiderka, 2004).

Obecně platí, že metody užívané ke screeningu CRC by měly mít specificitu vyšší než 90 % (Herzog, 2013). Specificita imunologických testů podle studie provedené v Německu kolísá od 58 do 96 % (Hundt et al., 2009).

Kvalitativní imunochemické testy iFOBT druhé generace mají oproti guajakovým dvojnásobnou senzitivitu, jejich specificita však výrazně klesla a vykazují vysokou falešnou pozitivitu (obr. 13).



Obr. 13 iFOBT vykazují vysokou senzitivitu, ale vysoké procento falešné positivity

Generace testů iFOBT se právě vzhledem k vysoké falešné pozitivitě a heterogenitě metod se pro screening neprosadila.

#### 4.4.3 Testy 3. generace qiFOBT

Optimální pro účel screeningu kolorektálního karcinomu se v současnosti jeví testy třetí generace, kvantitativní qiFOBT (Quantitative Immunochemical Faecal Occult Blood Test). Vznikly zdokonalením imunochemických testů, jež detekují specifické látky proti lidskému hemoglobinu. Koncentrace hemoglobinu je zjištěna kvantitativní analýzou vzorku stolice. Test vykazuje vysokou spolehlivost vhodným nastavením cut-off hodnoty. Prostřednictvím qiFOBT je tedy možné zjistit nejen přítomnost, ale i přesné množství krve ve stolici. Automatizace laboratorních technologií ovlivnila i vývoj přístrojů na zpracování vzorků stolice a detekci okultního krvácení. Vedle jednoduchých semikvantitativních fotometrických analyzátorů na kvantifikaci imunochemické reakce, kde je výsledek zobrazen přímo na displeji přístroje (pozitivní/negativní), například QuikRead FOB test (Orion), existují i složitější přístroje



pro kvantitativní analýzu s výsledným vyjádřením množství detekovaného hemoglobinu.

Odběrový systém QuickRead FOB zahrnuje testovací soupravu s plastovým kontejnerem k regulaci množství stolice, extrakční pufr a malý přístroj k vyhodnocení vzorku v ordinaci lékaře. Analyzátor lze v případě potřeby připojit také k laboratorním informačním systémům. Hodnocení testu je prováděno automaticky, výsledek je zobrazen na displeji přístroje do tří minut. Citlivost testu je nastavena magnetickou kartou na 1mg Hb/g stolice, rozsah detekce je 1 - 100 mg Hb/g stolice. Metoda QuickRead v současné době dává výsledek kvantitativní (+/-), ale je zde možnost přenastavení hladiny pro pozitivitu podle doporučené hraniční hodnoty pro danou populaci (Špičák et al., 2012).

Automatické analyzátoři pro kvantitativní stanovení Hb ve vzorku stolice vyrábí několik, převážně japonských firem. Jedná se například o analyzátoři FOBIT (Wako), HGS-180 (Jokohi), HM-Jack (Kyowa). V Evropě je dostupný přístroj japonské výroby OC-Sensor- $\mu$  (Eiken).

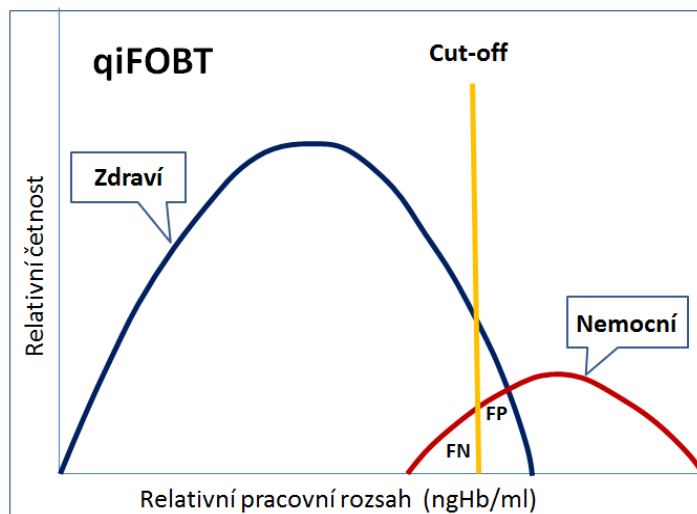
Analýza vzorků stolice prostřednictvím přístroje OC-Sensor je založena na latexové imunochemické aglutinační reakci s mnohonásobným monoklonálním antigenem k proteinu lidského hemoglobinu. Citlivost detekce se pohybuje v rozmezí 50 - 2000 ng Hb/ml. Identifikace vzorků je řešena interní jednotkou pro čtení čárových kódů. Detekční jednotkou je křemíková fotodioda. Kvantitativní stanovení Hb ve stolici pomocí výše zmíněného analyzátoru umožňuje individuální nastavení cut-off hodnoty. V praxi se analyzátor používá v základním screeningu s vyšší hodnotou detekčního limitu. Kapacita analyzátoru OC-Sensor- $\mu$  umožňuje až 80 vzorků za hodinu. Výrobce udává, na základě studie profesora Rozena z Tel Avivu, vysokou diagnostickou specifitu (95%).

Kvantitativní imunochemický test OC-Sensor sestává z víčka a tuby, součástí je odběrová tyčinka s drážkami na konci (Špičák, 2012). Po odběru z povrchu stolice se během zasunutí tyčinky s víčkem protlačí při průchodu membránou mezi drážkami tyčinky přesně 10 mg stolice do 2 ml stabilizujícího pufrovacího roztoku. Zkumavka se uchová v chladničce po odběru doma i následně v biochemické laboratoři. Analýza testu by měla proběhnout do 7 dnů. Vyhodnocení testu probíhá na automatickém analyzátoru v biochemické laboratoři pomocí latex aglutinační imunoturbidimetrické reakce s protilátkou k A0 lidskému hemoglobinu.

Metoda stanovuje hemoglobin s polyklonální protilátkou k Hb A0 IgG – respektive s mnohanásobnou monoklonální protilátkou (Kocna, 2012). Protilátka pro tuto analýzu vyžaduje vícenásobnou reakci pro aglutanační aktivitu, tedy mnohanásobnou monoklonální reakci. Vlastní analýza je prováděna turbidimetrickým měřením při 600 nm, kalibrace je většinou několikabodová v rozsahu 20 - 2000 ng Hb/ml.

Na stanovení lidského hemoglobinu ve stolici imunologickou reakcí antigen-protilátka je založen i přístroj italské výroby FOB Gold NG (Sentinel Diagnostics), v ČR dodávaný firmou GALI spol. s r.o., kdy lidský Hb přítomný ve vzorku rovněž reaguje s polyklonální protilátkou adsorbovanou na latexových částicích za vzniku aglutinových částic, jejichž nárůst je monitorován turbidimetricky při 570 nm. Princip automatické analýzy Hb ve stolici je tedy v podstatě stejný jako u analyzátoru OC-Sensor.

Kvantitativní imunochemické testy vykazují díky možnosti nastavení hraniční cut-off hodnoty výrazně vyšší senzitivitu i specificitu než předchozí generace FOBT (obr. 14).



Obr. 14 qiFOBT vykazují vysokou senzitivitu i specificitu

Kvantitativní testy qiFOBT jsou považovány v Evropských doporučeních pro zajištění kvality screeningu a diagnostiky CRC pro populační screening do budoucna za nejvhodnější, především s ohledem na zajištění kvality testovací metody (Seifert, 2012).

#### 4.4.4 Nové biomarkery, Septin 9

Rozvoj molekulární biologie a aplikace technologie PCR v rutinní diagnostice otvírají zcela nové možnosti i ve screeningu kolorektálního karcinomu.

Nádorovým markerem rozumíme chemickou substanci přítomnou v nádoru, nebo produkovanou nádorem nebo hostitelem jako odpověď na přítomnost tumoru (Adam et al., 2004). Tuto substanci lze využít k diferenciaci nádoru od normální tkáně, nebo uvažovat o přítomnosti tumoru na základě analýzy tělesných tekutin (Valík et al., 2008). Biomarker, nebo též biologický marker, je obecně látka používaná jako indikátor biologického stavu. Je měřitelná a může být objektivně vyhodnocena.

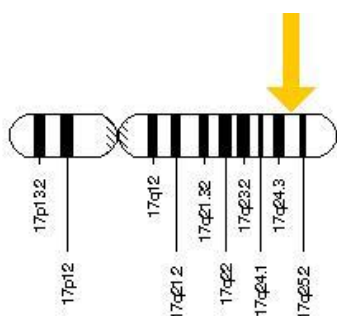
V poslední době se objevila možnost diagnostikovat CRC na základě genetického vyšetření stolice. Molekulární testy na přítomnost nádorové DNA byly hodnoceny v několika menších studiích (Herzog et al., 2013). Tyto studie ukazují, že test má přijatelnou citlivost, i když nemůže identifikovat všechny typy CRC.

Ve srovnání s metodami vyšetření stolice se jeví pro pacienty jako přijatelnější sérologické testy, kterými jsou rovněž zjišťovány genetické mutace. Jako takový je doporučován test, který spočívá v průkazu hypermetylovaného genu septin 9 v séru nebo v plazmě. V současné době je tento test používán ve screeningu CRC například v Kanadě a USA (Waren et al., 2011).

Proces metylace DNA se vyskytuje během onkogeneze, je stabilní, a může být testována v tkáních a tělních tekutinách (Model et al., 2007).

Metylace DNA je přirozený biologický proces, který slouží k regulaci genové exprese a k udržování stability genomu. Následkem metylace DNA je umlčování genů v důsledku inhibované vazby transkripčních faktorů.

**Septin 9** (SEPT9) je oficiální název genu, který je lokalizován na dlouhém (q) raménku chromozomu 17 v poloze 25 (Genetics Home Reference, 2009) (obr. 15).



Obr. 15 Detail lokalizace Septin 9 genu [cit. 2013-09-23]. Převzato z: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/SEPT9>

Gen SEPT9 poskytuje instrukce pro tvorbu proteinu zvaného septin 9, který je součástí skupiny bílkovin zvaných septiny (Genetics Home Reference, 2009). Septiny se podílejí na procesu zvaném cytokineze, což je krok v buněčném dělení, kdy se tekutina uvnitř buňky (cytoplasma) rozdělí za vzniku dvou samostatných buněk. Septin 9-protein také působí jako nádorový supresor. To znamená, že reguluje růst a dělení buněk a to velmi rychle, až nekontrolovaně. Zdá se, že gen SEPT9 může být aktivní v buňkách celého těla. Z tohoto genu může být produkováno přibližně patnáct, nepatrně odlišných verzí (izoformem). Různé typy buněk produkují jiné izoformy. Konkrétní rozložení těchto izoformem v tělesných tkáních není zatím přesně známo.

Septin 9 gen kóduje GTP-vazebný protein spojený s vláknitými strukturami cytoskeletu (Wasserkort et al., 2013). SEPT9 hraje roli v několika typech tumorů, buď jako onkogen nebo nádorový supresor.

Regulace exprese SEPT9 je složitá a dosud ne zcela jasná, naproti tomu hypermethylace genu byla nedávno zavedena jako biomarker pro včasné odhalení kolorektálního karcinomu (Wasserkort et al., 2013). Je spojena i s karcinomem prsu a tumory v oblasti hlavy a krku. Methylovaný Septin 9 je citlivý biomarker kolorektálního karcinomu z periferní krve (Tóth et al., 2012). Takový biomarker je důležitý pro včasnou detekci karcinomu, predikci nebo monitorování terapeutické odpovědi, a k odhalování recidivy onemocnění CRC (Fukushige, S. et al., 2013 & Waren et al., 2011).

Test spočívající v průkazu methylovaného genu pro septin 9 v séru nebo v plazmě, vykazuje podle studií (Muralidharan et al., 2010 & Grützmann et al., 2008) senzitivitu 63 – 72 % a specificitu 89 – 90 %. Pro vysoký stupeň senzitivity a specificity tento test ve srovnání s gFOBT detekuje CRC lépe a v porovnání iFOBT přinejmenším stejně dobře. Je dostupný i v ČR, ale pro časovou, personální i ekonomickou náročnost se s jeho zařazením do screeningu u nás nepočítá (Špičák et al. 2012).

## **PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 Stanovení qiFOBT

Cílem praktické části předkládané bakalářské práce bylo seznámit se s technikou a praktickým provedením kvantitativního testu na okultní krvácení do stolice v klinické praxi. Praktická část byla realizována na specializovaném pracovišti Oddělení klinické biochemie (OKB) Fakultní nemocnice v Olomouci.

### 5.1 Materiál a přístrojové vybavení

#### Přístrojové vybavení:

Automatický analyzátor OC-Sensor- $\mu$

Výrobce: EIKEN Chemical co., Japonsko

Dodavatel: Dialab s.r.o., Nám. Osvoboditelů 1, 153 00 Praha 5

#### Reagencie a spotřební materiál:

OC Auto 3 latex reagent (kat. č. V-PH33) 2x7 ml, 1 lahvička obsahuje 1,4 ml senzibilizované králičí antiHbA0 IgG protilátky na částicích latexu

OC Auto 3 pufr (V-PH46) 1x200 ml, 1 lahvička obsahuje 2,38 g HEPES

OC Standard (V-IX50) 10x1ml

OC Control Low (V-PH57) 5x1ml

OC Control High (V-PH58) 5x1ml

Odběrové zkumavky na stolici k analyzátoru OC Sensor  $\mu$

Kyvety do analyzátoru OC-Sensor- $\mu$

Ostatní spotřební materiál (kepy, zkumavky eppendorf, žluté a modré špičky)

### 5.2 Biologický materiál

Pacientem byl odebrán a následně transportován do laboratoře vzorek stolice. Stolica byla odebrána do speciální plastové odběrové zkumavky s pufrem. Odběr se provádí odebráním stolice kartáčkem a následně zasunutím do kazety. Kazeta je navržena tak, aby po průchodu bylo odděleno přesné množství vzorku stolice (10 mg) a převedeno do stabilizačního roztoku. Kazeta již zůstává uzavřena a je co nejdříve dopravena do laboratoře (obr. 16).



Obr.16 Schéma provedení odběru vzorku stolice a jeho převedení do stabilizačního roztoku  
Převzato z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/qi-fobt.pdf>

V období od 4. 10. 2013 do 8. 1. 2014 bylo v laboratoři hodnoceno celkem 141 vzorků stolice od 71 mužů a 70 žen ve věku 6 – 92 let (tab. 5).

Tab. 5 Tabulka vyšetřovaných vzorků

Označení vzorku	Věk (roky)	Pohlaví	Označení vzorku	Věk (roky)	Pohlaví	Označení vzorku	Věk (roky)	Pohlaví
81	6	muž	92	59	žena	116	70	žena
9	7	žena	16	60	žena	117	70	žena
48	12	muž	72	60	muž	121	70	muž
49	12	muž	29	61	muž	122	70	muž
85	15	žena	68	61	muž	123	70	muž
3	24	žena	111	61	žena	127	70	žena
15	25	žena	113	61	žena	11	71	muž
63	25	žena	141	61	muž	77	71	žena
65	33	žena	73	62	žena	30	72	žena
66	33	žena	38	63	muž	118	72	muž
67	33	žena	59	63	žena	119	72	muž
31	34	muž	60	63	žena	120	72	muž
54	37	muž	61	63	žena	13	74	muž
55	37	muž	70	63	muž	76	74	žena
56	37	muž	71	63	muž	95	74	žena
43	38	muž	112	63	muž	6	75	žena
42	40	žena	114	63	muž	17	75	muž
99	42	žena	10	64	muž	21	75	muž
100	42	žena	5	65	žena	131	75	muž
101	42	žena	74	65	žena	91	76	muž

86	<b>44</b>	muž	75	<b>65</b>	žena	23	<b>77</b>	muž
87	<b>44</b>	muž	82	<b>65</b>	žena	44	<b>78</b>	žena
88	<b>44</b>	muž	109	<b>65</b>	muž	78	<b>78</b>	muž
32	<b>45</b>	muž	20	<b>66</b>	žena	84	<b>78</b>	muž
19	<b>50</b>	muž	46	<b>66</b>	muž	33	<b>81</b>	žena
79	<b>50</b>	žena	103	<b>66</b>	muž	53	<b>81</b>	muž
80	<b>50</b>	žena	14	<b>67</b>	žena	69	<b>81</b>	muž
102	<b>50</b>	žena	50	<b>67</b>	muž	90	<b>81</b>	žena
124	<b>50</b>	žena	104	<b>67</b>	muž	64	<b>82</b>	žena
24	<b>51</b>	muž	140	<b>67</b>	muž	129	<b>82</b>	muž
1	<b>52</b>	žena	12	<b>68</b>	muž	2	<b>83</b>	muž
34	<b>53</b>	muž	39	<b>68</b>	žena	35	<b>83</b>	žena
52	<b>53</b>	žena	40	<b>68</b>	žena	137	<b>83</b>	žena
133	<b>54</b>	muž	93	<b>68</b>	muž	110	<b>84</b>	muž
134	<b>54</b>	muž	107	<b>68</b>	žena	125	<b>84</b>	žena
136	<b>54</b>	muž	58	<b>69</b>	muž	94	<b>85</b>	žena
27	<b>55</b>	muž	132	<b>69</b>	muž	97	<b>85</b>	žena
98	<b>55</b>	žena	135	<b>69</b>	muž	36	<b>86</b>	žena
4	<b>56</b>	žena	138	<b>69</b>	muž	139	<b>87</b>	muž
18	<b>56</b>	muž	22	<b>70</b>	žena	26	<b>88</b>	žena
28	<b>56</b>	muž	25	<b>70</b>	žena	130	<b>91</b>	muž
41	<b>56</b>	žena	37	<b>70</b>	žena	51	<b>92</b>	žena
45	<b>56</b>	muž	47	<b>70</b>	žena	96	<b>92</b>	žena
7	<b>57</b>	muž	57	<b>70</b>	žena	105	<b>92</b>	muž
8	<b>57</b>	muž	83	<b>70</b>	žena	106	<b>92</b>	muž
62	<b>57</b>	žena	89	<b>70</b>	žena	108	<b>92</b>	muž
128	<b>58</b>	žena	115	<b>70</b>	žena	126	<b>92</b>	žena

### 5.3 Princip metody

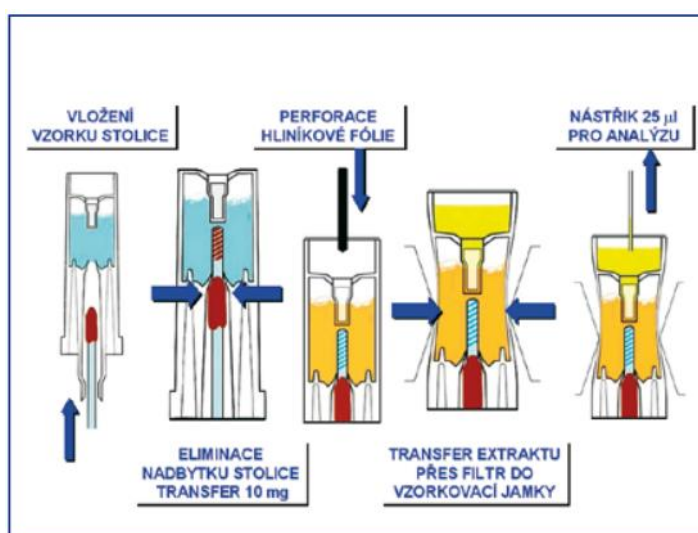
Stanovení lidského hemoglobinu ve stolici metodou qiFOBt je založeno na vícenásobné imunologické reakci hemoglobinu s monoklonální protilátkou k Hb A0 IgG.

Hemoglobin přítomný ve vzorku stolice reaguje s protilátkou proti Hb, adsorbovanou na latexových částicích, za vzniku aglutinovaných částic. Při aglutinační reakci dochází ke spojení antigenu a protilátky. Nárůst aglutinovaného imunokomplexu je zjišťován turbidimetrickým měřením při 600 nm, založeným na monitorování procházejícího světla. Vlastní měření probíhá dvakrát. Před aglutinací je odečtena vstupní hodnota a po aglutinaci s hemoglobinem je turbidimetricky odečtena změna absorbance a následně přepočtena koncentrace vzorku.



## 5.4 Pracovní postup

- Vzorke pro analýzu byly bezprostředně po doručení do laboratoře identifikovány prostřednictvím čárového kódu (identifikace vzorků je řešena prostřednictvím interní čtečky čárových kódů, a do doby zpracování (do jednoho týdne) uchovávány v lednici při teplotě 2 - 8°C.
- Před vlastní analýzou bylo provedeno vytemperování vzorků na laboratorní teplotu.
- Současně se vzorky pacientů a jednorázovými měřicími kyvetami byly do analyzátoru vloženy i dvě standardní kontroly, jako součást vnitřní kvality měření.
- Reagencie OC Auto 3 latex reagent a OC Auto 3 pufr byly rovněž vytemperovány na laboratorní teplotu.
- Lahvička s OC Auto 3 latex byla ručně protřepána a vsunuta do unašeče reagentu.
- Analyzátor byl spuštěn podle volby nabízené v menu.
- V analyzátoru byly kazety mechanicky stisknuty, čímž došlo k filtraci vzorku stolice uvnitř odběrové kazety a jeho převedení do vzorkovací jamky pod hliníkovou fólií.
- Hliníková fólie byla následně perforována a jehlou bylo odebráno 25 µl filtrovaného extraktu do měřicí kyvety k analýze (obr. 17).



Obr. 17 Odběrový systém OC-Sensor-µ (Převzato a upraveno z: [www.dialab.cz](http://www.dialab.cz))

## 6 Výsledky

Výsledky měření jsou vydávány v jednotkách ng/ml. Udávaná mez detekce je 20 ng/ml. Hodnota cut-off pro detekci kolorektálních karcinomů je 100 ng/ml. Tato hodnota byla převzata z návodu výrobce, který udává při této hodnotě specificitu 95,3 % a senzitivitu 76,5%.

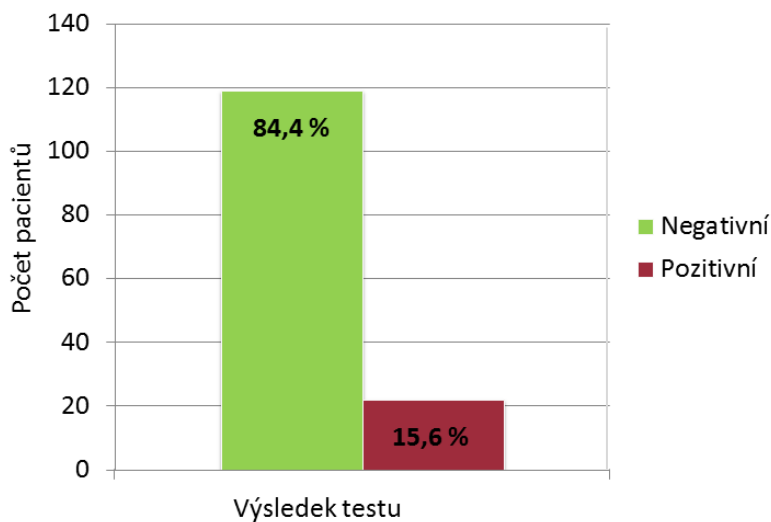
Z celkového počtu 141 vyšetřených vzorků stolice bylo 22 vzorků pozitivních na základě překročení hodnoty cut-off u hemoglobinu (100 ng/ml), v tabulce jsou tyto hodnoty vyznačeny červeně (tab. 6). Hodnota nad měřicí rozsah analyzátoru se vydává jako výsledek >2000.

Tab 6 Výsledky vlastního měření

Označení vzorku	Koncentrace Hb ng/ml	Interpretace	Označení vzorku	Koncentrace Hb ng/ml	Interpretace	Označení vzorku	Koncentrace Hb ng/ml	Interpretace
46	>2000	pozitivní	15	7	negativní	75	0	negativní
66	>2000	pozitivní	16	7	negativní	77	0	negativní
6	>2000	pozitivní	73	6	negativní	78	0	negativní
69	>2000	pozitivní	136	6	negativní	79	0	negativní
1	>2000	pozitivní	14	3	negativní	80	0	negativní
11	>2000	pozitivní	126	2	negativní	81	0	negativní
93	>2000	pozitivní	24	1	negativní	82	0	negativní
83	>2000	pozitivní	3	0	negativní	84	0	negativní
50	>2000	pozitivní	4	0	negativní	86	0	negativní
58	>2000	pozitivní	5	0	negativní	87	0	negativní
61	1031	pozitivní	7	0	negativní	88	0	negativní
9	564	pozitivní	8	0	negativní	89	0	negativní
13	538	pozitivní	10	0	negativní	90	0	negativní
27	381	pozitivní	12	0	negativní	92	0	negativní
35	340	pozitivní	17	0	negativní	94	0	negativní
60	329	pozitivní	19	0	negativní	96	0	negativní
30	196	pozitivní	20	0	negativní	97	0	negativní
130	183	pozitivní	21	0	negativní	98	0	negativní
103	173	pozitivní	22	0	negativní	99	0	negativní
39	147	pozitivní	25	0	negativní	105	0	negativní
72	120	pozitivní	28	0	negativní	107	0	negativní
91	101	pozitivní	29	0	negativní	109	0	negativní
95	70	negativní	31	0	negativní	110	0	negativní
59	67	negativní	32	0	negativní	111	0	negativní
119	63	negativní	33	0	negativní	112	0	negativní
26	60	negativní	36	0	negativní	113	0	negativní
85	57	negativní	38	0	negativní	114	0	negativní
100	50	negativní	40	0	negativní	115	0	negativní
106	50	negativní	41	0	negativní	116	0	negativní
18	47	negativní	42	0	negativní	117	0	negativní
2	45	negativní	43	0	negativní	120	0	negativní
76	41	negativní	44	0	negativní	121	0	negativní
118	36	negativní	48	0	negativní	122	0	negativní
134	36	negativní	49	0	negativní	123	0	negativní
101	34	negativní	51	0	negativní	124	0	negativní
102	34	negativní	52	0	negativní	125	0	negativní
53	32	negativní	54	0	negativní	127	0	negativní
104	25	negativní	55	0	negativní	128	0	negativní

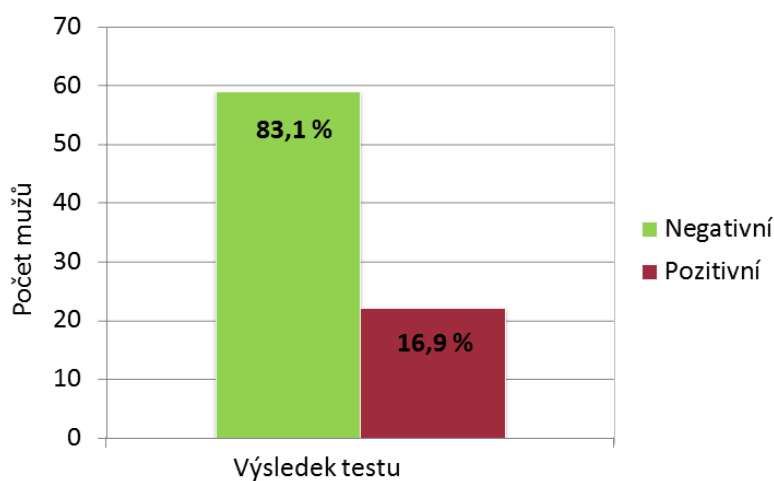
108	25	negativní	56	0	negativní	129	0	negativní
133	25	negativní	57	0	negativní	131	0	negativní
34	23	negativní	62	0	negativní	132	0	negativní
70	20	negativní	64	0	negativní	135	0	negativní
45	13	negativní	65	0	negativní	137	0	negativní
23	11	negativní	67	0	negativní	138	0	negativní
47	11	negativní	68	0	negativní	139	0	negativní
63	11	negativní	71	0	negativní	140	0	negativní
37	9	negativní	74	0	negativní	141	0	negativní

Následující graf znázorňuje výsledky všech testovaných vzorků (obr. 18).



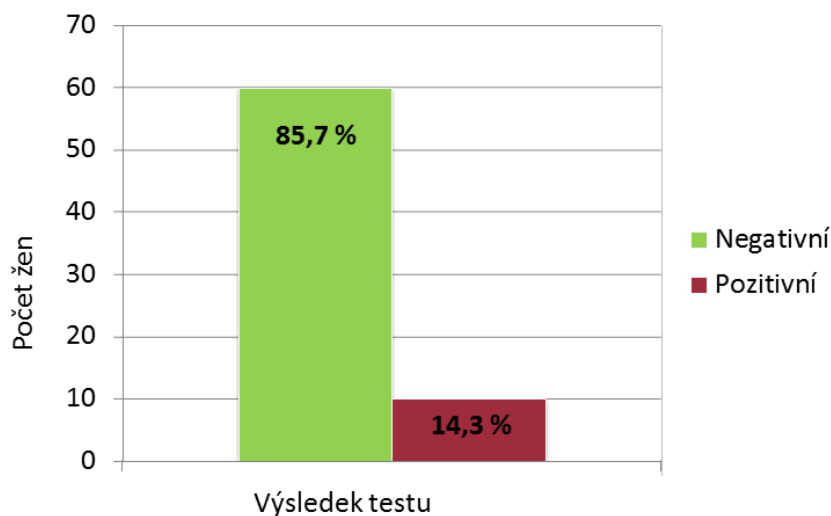
Obr. 18 Grafické znázornění všech výsledků qiFOBT (119 vzorků negativních, tj. 84,4 %, 22 vzorků pozitivních, tj. 15,6 %)

Z celkového počtu vzorků 71 mužů bylo 59 negativních, respektive 12 pozitivních, jak je znázorněno v grafu (obr. 19).



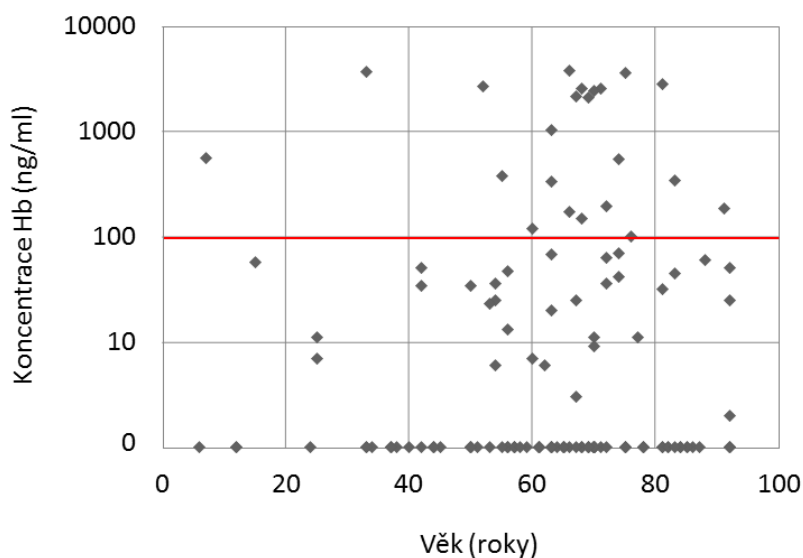
Obr. 19 Grafické znázornění výsledků na základě pohlaví - muži (59 vzorků negativních, tj. 83,1 %, 12 vzorků pozitivních, tj. 16,9 %)

Z celkového počtu vzorků 70 žen bylo 60 negativních, respektive 10 pozitivních, jak je znázorněno v grafu (obr. 20).



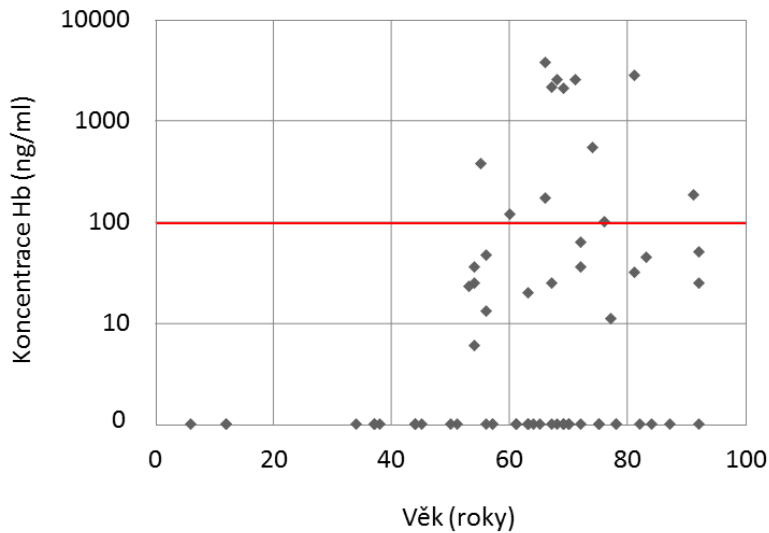
Obr. 20 Grafické znázornění výsledků na základě pohlaví - ženy (60 vzorků negativních, tj. 85,7 %, 10 vzorků pozitivních, tj. 14,3 %)

Pacienti, zahrnutí v měření, spadali do věkové kategorie 6 - 92 let, největší zastoupení (66,6 %) měly osoby ve věku 50 - 80 let. (obr. 21).



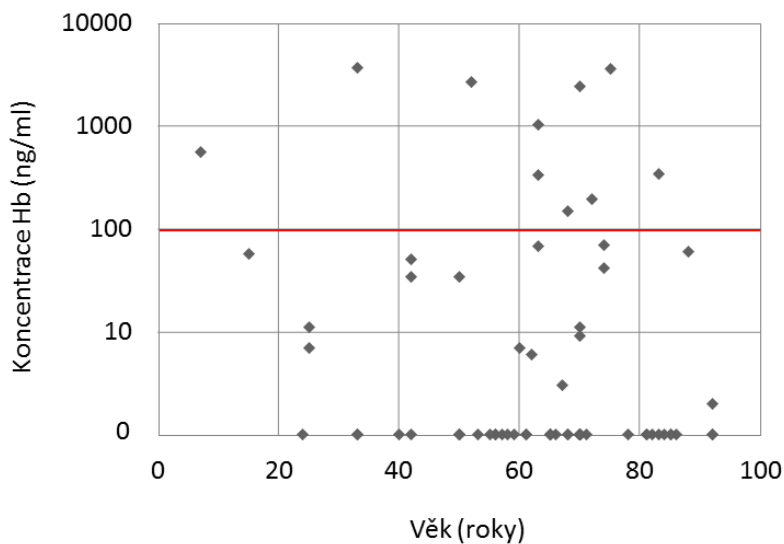
Obr. 21 Graf závislosti koncentrace Hb na věku pacientů bez ohledu na pohlaví (cut-off 100 ng/ml je vyznačena červeně)

Při srovnání závislosti na věku a pohlaví byl zjištěn vyšší výskyt pozitivních výsledků u mužů. Pozitivní výsledky u mužů byly ve všech případech detekovány u pacientů ve věku nad 50 let (obr. 22).



Obr. 22 Graf závislosti koncentrace Hb na věku a pohlaví – muži (cut-off 100 ng/ml je vyznačena červeně)

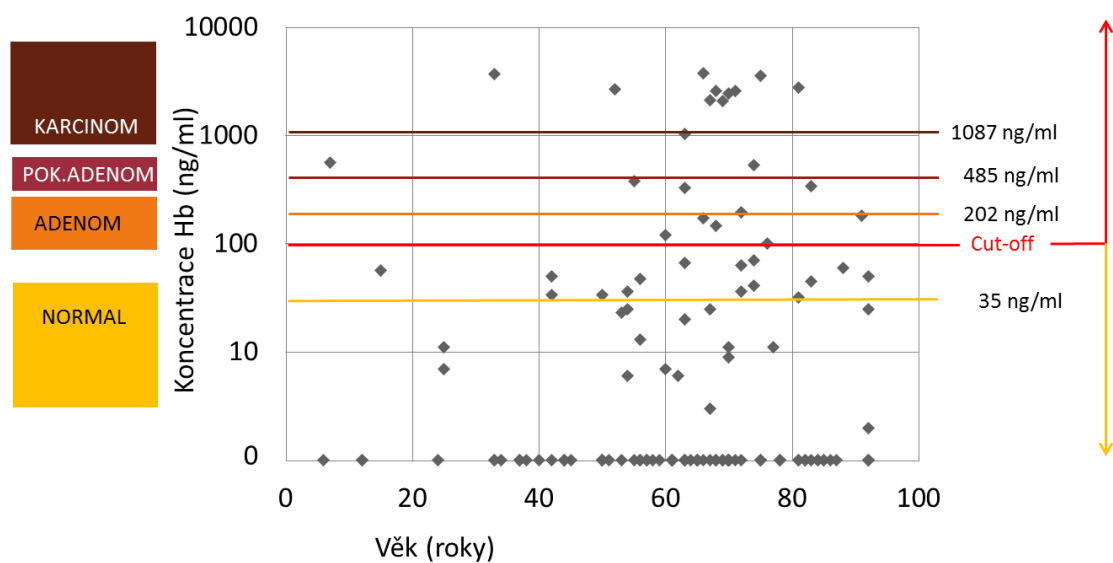
V případě žen byl zjištěn v několika případech pozitivní výsledek u pacientek do padesáti let, na rozdíl od mužů, kde tento jev nebyl ve sledovaném období zaznamenán (obr. 23).



Obr. 23 Graf závislosti koncentrace Hb na věku a pohlaví – ženy (cut-off 100 ng/ml je vyznačena červeně)

Lze provést i detailnější vyhodnocení podle jednotlivých stádií, například srovnáním s výsledky Leviho studie provedené na pracovišti profesora Rozena v Tel Avivu (2007), kdy byla na základě závislosti detekovaného množství Hb v souboru zdravých kontrol a nemocných s CRC potvrzených následnou kolonoskopií určena rozmezí pro jednotlivá stadia onemocnění CRC. Studie byla provedena při hraniční hodnotě 100 ng/ml při počtu tří qiFOBT. Záchyt klinicky signifikované neoplazie (pokročilé adenomy a karcinomy) dosahoval senzitivity 67 % a specificity 91,4 %.

Hodnoty námi naměřených koncentrací Hb jsem porovnávala s možnými patologickými nálezy podle uvedené Leviho studie v následujícím grafu (obr. 24).



Obr.24 Graf vyhodnocení výsledků qiFOBT podle možné patologie onemocnění CRC (normální nález, adenom, pokročilý adenom, karcinom) ve srovnání s Leviho studií

## 7 Diskuze

Kolorektální karcinom patří v naší republice k nejčastějším maligním onemocněním u obou pohlaví. V předkládané práci jsme ve skupině 141 pacientů hodnotili výsledky qiFOBT, které při pozitivním hodnocení testu mohou být varovným signálem pro možný výskyt CRC. Podle Herzoga (2013) bylo prokázáno, že koncentrace hemoglobinu ve stolici koreluje s rizikem kolorektálního karcinomu. Z celkového počtu provedených testů v rámci našeho šetření bylo 22 pozitivních, což je 15,6 %. Podle údajů Národního onkologického registru ČR byla v roce 2010 incidence kolorektálního karcinomu 78,47 případů na 100 000 obyvatel, tj. asi 0,078 %. Vyšší procento námi zachycených pozitivních vzorků je dáno specifickým výběrem pacientů - ambulantních i hospitalizovaných.

Pozitivní výsledky provedených qiFOBT se vyskytovaly nejčastěji ve věkové kategorii 50 - 80 let s převahou osob v sedmém deceniu – 8 vzorků, tj. 36,3 % ze všech pozitivních testů. Podle literatury, stejně jako v našem měření, výskyt kolorektálního karcinomu výrazně narůstá po 50. roce života a nejvyšší počty se nachází ve věkové skupině 65 - 79 let (Seifert 2012a).

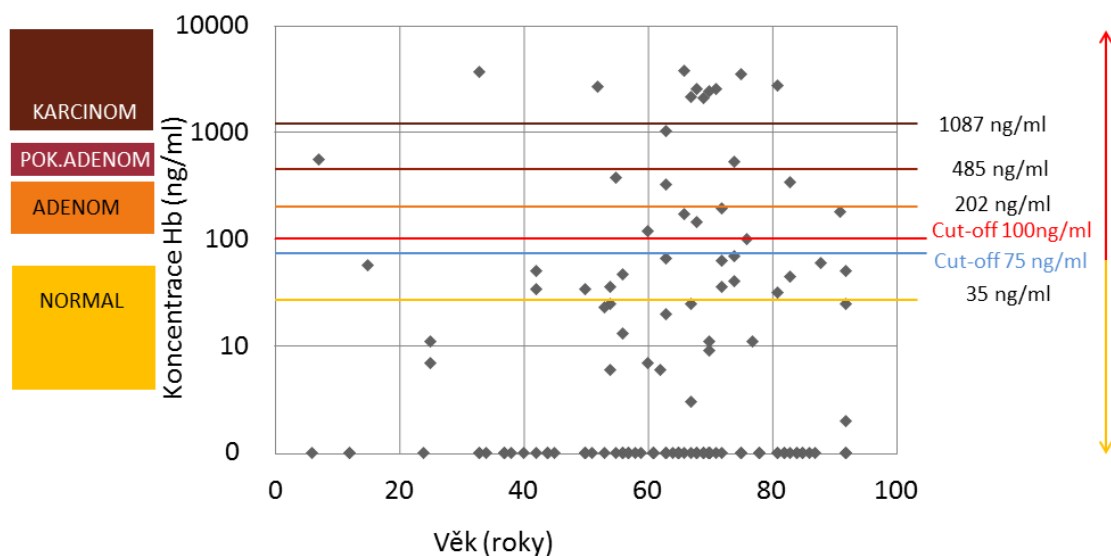
U deseti pacientů převyšovala koncentrace Hb hodnotu 2000 ng/ml a dvanáct vzorků se pohybovalo v intervalu 100 - 2000 ng/ml. Předpokládaná souvislost mezi kvantitativně stanovenou hodnotou hemoglobinu ve stolici a možným stadiem onemocnění odpovídá údajům v literatuře, kdy téměř polovina CRC je zachycena v pozdním stadiu nemoci III a IV (Holubec et al., 2004).

Diskutovanou otázkou zůstává u qiFOBT problematika nastavení rozhodovací meze detekce hemoglobinu. Jednotlivé vyspělé země řeší nastavení cut-off individuálně s ohledem na epidemiologické výstupy, ekonomické možnosti a rovněž kapacitu sítě kolonoskopických screeningových center. V ČR probíhá diskuze, jakou nastavit optimální hraniční hodnotu pro detekci krve ve stolici pro potřeby screeningu. Česká pilotní studie, publikovaná v roce 2012, doporučuje pro screening CRC provedení jednoho imunochemického testu s cut-off hodnotou 75 ng/ml s prokázanou spolehlivostí detekce karcinomu nebo pokročilého adenomu, tedy výsledky přinejmenším srovnatelné s Leviho studií (Kovářová et al. 2012). Podle Kovářové byla v České studii na souboru 815 kolonoskopovaných pacientů prokázána senzitivita 73 % a specifická 90,1 % pro pokročilé adenomy a karcinomy.

Česká pilotní studie má velký význam právě z důvodu osob zahrnutých v šetření pocházejících z české populace, zatížené vysokou incidencí onemocnění. Z těchto důvodů se Česká republika, na základě doporučení, pravděpodobně přikloní ke zvýšení senzitivity qiFOBT při provedení jednoho testu s cut-off hodnotou 75 ng/ml v rámci screeningu CRC, a tím k možnosti zachytit více pokročilých adenomů a časných stádií kolorektálního karcinomu.

V případě našeho provedeného měření se ovšem žádná hodnota v rozmezí 75 - 99 ng/ml, na které by bylo možné ukázat význam snížení cut-off, nevyskytla. Aby mělo analyzované měření statisticky vypovídající hodnotu, bylo by třeba do vyhodnocení zahrnout více pacientů (obr. 25).

Pro potvrzení, respektive vyloučení předpokládané hypotézy na základě výsledků qiFOBT je také nezbytné její ověření následným lékařským vyšetřením, které vede k určení upřesňující diagnózy.



Obr. 25 Graf vlivu nastavení cut-off 75 ng/ml (Česká studie; znázorněno modře), a 100ng/ml - (Leviho studie; znázorněno červeně), na senzitivitu a specificitu qiFOBT (OC-Sensor) pro pokročilé adenomy a karcinomy

Z uvedeného porovnání vyplývá, že z důvodu koncentrace hemoglobinu 1031 ng/ml a vyšších v námi provedeném měření existuje riziko výskytu karcinomu nebo pokročilého adenomu u 11 pacientů, u dalších 11 pozitivních pacientů lze předpokládat různé formy adenomu (tab. 7).



Tab 7 Stanovení Hb ve stolici – diagnostická specifická kolorektálního karcinomu ve srovnání s naměřenými hodnotami

Rozmezí hodnot	Rozmezí hodnot (ng/ml)	Počet pacientů (OKB FNOL)	Možná interpretace
Nižší hodnoty	0 – 24	<b>101</b>	Normální
	25 – 45		
Normální	(střední 35)	<b>10</b>	Normální
Mezihodnoty	46 – 139	<b>10</b>	Možný adenom
	140 – 263		
Adenom	(střední 485)	<b>4</b>	Adenom
			Možný adenom/pokročilý adenom
Mezihodnoty	264 – 314	<b>0</b>	
	315 – 654		
Pokročilý adenom	(střední 202)	<b>5</b>	Pokročilý adenom
			Možný pokročilý adenom/karcinom
Mezihodnoty	655 – 696	<b>0</b>	
	697 – 1477		
Karcinom	(střední 1087)	<b>1</b>	Karcinom
Vyšší hodnoty	> 1478	<b>10</b>	Karcinom

Ve skupině mužů bylo z celkového množství provedených testů zjištěno více pozitivních výsledků (16,9 %) než ve skupině žen (14,3 %). V celkovém srovnání pozitivních nálezů podle pohlaví je jasná prevalence u mužské populace (54,5 %). Podle literatury se převaha výskytu CRC u mužů předpokládá (Vyzula 2009). Za pozornost stojí srovnání výskytu pozitivních testů ve věkovém rozmezí 60 - 79 let podle pohlaví, kde se nachází u žen v tomto intervalu o třetinu méně pozitivních testů (6 vzorků), než u mužů (9 vzorků). Zjištění odpovídá literatuře, kde je uvedeno, že u žen je kolorektální karcinom méně častý, respektive křivka jeho vzrůstající incidence v souvislosti s věkem je opožděná (Špičák 2012). U mužů jsme ve výsledcích zaznamenali největší zastoupení pozitivních nálezů v sedmém deceniu (6 vzorků), u žen až v osmém (3 vzorky). V našem testování se naopak nepotvrdila uváděná převaha onemocnění u žen v devátém a desátém deceniu (Seifert 2012a), jež je dána jejich vyšším podílem v populaci. V našem případě pozitivní vzorky nejstarších pacientů patřily mužům - vzorek 69 (81 let) a 130 (91 let) a jen jeden vzorek 35 (83 let) ženě.

U pozitivních výsledků žen je zřejmý větší rozptyl ve výskytu podle věku. Zvláště hodnoty 564 ng/ml – 7 let, >2000 ng/ml – 33 let u pacientek 9 a 66 se vymykají

souvislosti nárůstu pravděpodobnosti onemocnění CRC s věkem. Podle Seiferta (2012a) je výskyt kolorektálního karcinomu do 35 let vzácný. V případě positivity u mladších pacientek v produktivním věku může být jednou z možných příčin odběr vzorku v menstruačním období, respektive těsně před nebo po menstruaci. Přítomnost Hb ve stolici může být způsobena také řadou jiných nenádorových onemocnění. Jde hlavně infekční a zánětlivá onemocnění střeva, což může být možná příčina krvácení u sedmiletého dítěte (Kovářová et al. 2012).

Na základě prostudované literatury a provedených studií (Jochim S., et al., 2010, Kovářová et al. 2012, Levi Z., et al., 2007) je zřejmé, že kvantitativní stanovení hemoglobinu je jen orientačním ukazatelem rozsahu patologického nálezu. Přesnější informaci o možném charakteru kolorektálního karcinomu může poskytnout až provedené následné kolonoskopické vyšetření.

## 8 Závěr

Cílem práce bylo předložit principy, parametry a možnosti screeningových metod pro detekci kolorektálního karcinomu se zaměřením na laboratorní diagnostiku v České republice a jejich srovnání se zahraničím. Dále bylo úkolem popsat algoritmus pro vyšetřování kolorektálního karcinomu u nás a ve světě. Do práce jsem zahrнула jednak starší metody FOBT, které v minulosti prokázaly ve screeningu kolorektálního karcinomu důležitou úlohu, ale jsou již překonány modernějšími metodami s lepšími parametry. Na druhé straně jsem předložila i metody, které se mohou uplatnit v budoucnosti. Nedílnou součástí práce bylo i praktické seznámení s technikou pro stanovení qiFOBT, příprava vzorků pro vyšetření, provedení analýzy testů a jejich vyhodnocení. Provedená analýza výsledků praktické části, i přes omezený počet pacientů našeho výzkumu, korelovala s obecnými epidemiologickými daty uváděnými v literatuře. Potvrdili jsme na základě našich výsledků v porovnání s výsledky uváděných studií, že metoda kvantitativního stanovení Hb je velmi důležitá a přínosná pro diagnostiku CRC.

Kolorektální karcinom je závažné onemocnění, které představuje pro pacienta zásadní omezení způsobu života, někdy může být doprovázené fatálními následky. Kolorektální karcinom se stal svou četností v populaci a nákladností péče o nemocné s touto diagnózou v České republice celospolečenským problémem. Screening sporadického kolorektálního karcinomu má v naší zemi dlouhou tradici. Screeningové programy zahrnují hlavně laboratorní metody detekce okultního krvácení, detekci nádorových markerů a ze zobrazovacích metod především screeningovou kolonoskopií.

Populační screening kolorektálního karcinomu je složitý program, který předpokládá souhru všech zúčastněných subjektů. Důležitou roli hraje dobře organizovaná síť primární péče, kvalitní osvěta a propagace spolu s onkologickými registry umožňujícími vyhodnocení dat.

Úspěch celého projektu screeningu kolorektálního karcinomu závisí na nejdůležitějším faktoru a tím je masová účast populace. Ústřední role v něm zůstává praktickým lékařům. K větší účasti žen ve screeningu CRC přispívá v posledních pěti letech vstup ambulantních gynekologů, kteří rovněž vydávají a hodnotí FOBT. V roce 2013 přichází další impulz ke zvýšení efektivity kolorektálního karcinomu ve formě adresného zvaní. Větším problémem však zůstává stále nízká účast mužů.

## Seznam použité literatury

Adam Z., Krejčí M., Vorlíček J. et al. (2010) Speciální onkologie, pp. 394, Galén. ISBN 978-80-7262-648-9

Adam Z., Krejčí M., Vorlíček J. et al. (2004) Obecná onkologie, pp. 417, Masarykova univerzita v Brně LF. ISBN 80-210-3574-9

Alberts B. et al. (1998) Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky, pp. 630, Espero Publishing. ISBN 80-902906-2-0

Castiglione G., Zappa M., Grazzini G., Mazzotta A., Biagini M., Salvadori P., Ciatto S., (1996) Immunochemical vs guaiac faecal occult blood tests in a population-based screening programme for colorectal cancer. *Br J Cancer*. Jul 1996; 74(1): p 141-144

Dušek L., et al. (2012) Epidemiologie, prevence a léčba kolorektálního karcinomu dle dostupných českých a mezinárodních dat, pp. 199, Fakultní nemocnice v Motole. ISBN 978-80-87347-07-2

Fajt T., Vráblík M., Češka R. et al. (2011) Preventivní medicína, pp. 770, Maxdorf. ISBN 978-80-7345-237-7

Frič P., Zavoral M., Seifert B, Pokorný P, Suchánek Š (2007) Screening sporadického kolorektálního karcinomu v ČR. *Interní medicína pro praxi*, 2007/5; p. 221-224

Fukushige S., Horii A. (2013) DNA methylation in cancer: a gene silencing mechanism and the clinical potential of its biomarkers. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 229; p 173-185

Gnauck R. (1980) World Health Organization criteria for screening In: Winawer SJ, Schottenfield D., Sherlock P. (eds), Colorectal cancer: prevention, epidemiology and screening. *Raven Press, New York*; p 175–180

Grützmann R., Molnar B., Pilarski Ch., Habermann J. K., Schlag P. M., Saeger H. D., Miehke S., Stolz T., Model F., Roblick U. J., Bruch H. P., Koch R., Liebenberg V., deVos T., Song X., Day R. H., Sledziewski A. Z., Day C. L. (2008) Sensitive Detection of Cancer in Peripheral Blood by Septin 9 DNA Methylation Assay. *PLoS One*. 2008; 3: e3759.

Herzog J., Eickhoff A., Riemann J. F. (2013) Nové vyšetřovací metody pro prevenci kolorektálního karcinomu. *Medicína po promoci*, 2013, roč. 14, č. 1, s. 4-7. ISSN: 1212-9445

Holubec L. et al. (2004) Kolorektální karcinom – Současné možnosti diagnostiky a léčby, pp. 175, Grada Publishing a.s.. ISBN 80-247-0636-9

Hundt S., Haug U., Brenner H. (2009) Comparative evaluation of immunochemical fecal occult blood tests for colorectal adenoma detection. *Annals for Internal Medicine*, 2009, 150; p. 162-169

- Jochim S., Terhaar sive Droste, Frank A., Oort René W.M. van der Hulst et al. (2010) Higher fecal immunochemical test cutoff levels: Lower positivity rates but still acceptable detection rates for early-stage colorectal cancers. *Cancer epidemiology biomarkers&preventiv*, Publisher online 01/12 2010
- Kaemmerer E., Klaus C., Jeon M.K. Gassler N. et al. (2013) Molecular classification of colorecta carcinomas: The genotype-to-phenotype relation . *World J Gastroenterol* 12/2013. ISSN 1007-9327
- Klener P., Klener P., jr. (2006) Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii, pp. 209, Grada Publishing a.s., Praha. ISBN 978-80-247-2808-7
- Klener P., (2011) Základy klinické onkologie, pp. 96, Galén, Praha. ISBN 978-80-7262-755-4
- Kovářová J. T., Zavoral M., Zima T., Žák A., Kocna P., Kohout P., Granátová J., Vaníčková J., Vránová J., Suchánek Š., Beneš Z., Celko M. A., Povýšil C. (2012) Improvements in colorectal cancer screening programmes – quantitative immunochemical faecal occult blood testing – how to set the cut-off for a particular population. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2012, 156(2):143-150
- Levi Z., Rozen P., Hazazi R. et al. (2007) A quantitative immunochemical fecal occult blood test for colorectal neoplasia. *Ann Intern Med*, 2007, 146, p. 244 – 255.
- Model F., Osborn N., Ahlquist D., Gruetzmann R., Molnar B., Sipos F., Galamb O., Pilarsky C., Saeger H.D., Tulassay Z., Hale K., Mooney S., Lograsso J., Adorjan P., Lesche R., Dessauer A., Kleiber J., Porstmann B., Sledziewski A., Lofton.Day C. (2007) Identification and validation of colorectal neoplasia-specific methylation markers for accurate classification of disease. *Mol Cancer Res.* 2007/2;5(2); p 153-63.
- Muralidharan K., Tint M.S., Chadha K.A., Chou P.P., Pratt V.M. (2010) Detecting colorectal cancer based on presence of methylated septin 9 DNA in plasma. *J Clin Oncol* 2010; 28:e14071
- Musil D., (2003) Populační skrining kolorektálního karcinomu. *Interní medicína pro praxi*, 2003/3; p 126-130
- Novotný J., Vitek P. et al. (2012) Onkologie v klinické praxi, pp. 531, Mladá fronta a. s.. ISBN 978-80-204-2663-5
- Racek J. et al. (2006) Klinická biochemie, pp. 329, nakladatelství Galén, Praha. ISBN 80-7262-324-9
- Rozen P., Waked A., Vilkin A., Levi Z., Niv Y. (2006) Evaluation of a desk top instrument for the automated development and immunochemical quantification of fecal occult blood. *Med Sci Monit.* 006 Jun;12(6): MT27-32

- Segnan J, Patnick L, von Karsa L. (2010) European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening diagnosis, pp. 450, European Commission, Publications Office of the European Union. ISBN 978-92-79-16435-4
- Seifert B. (2012a) Screening kolorektálního karcinomu, příručka pro všeobecné praktické lékaře, pp. 112, Maxdorf. ISBN 978-80-7345-306-0
- Seifert B. (2012b) Screening kolorektálního karcinomu, edice ambulantní gynekologie, pp. 112, Maxdorf. ISBN 978-80-7345-309-1
- Schneiderka J. et al. (2004) Kapitoly z klinické biochemie, pp. 365, Nakladatelství Karolinum, UK Praha. ISBN 80-246-0678-X
- Snustad D. P., Simmons M. J. (2009) Genetika, pp. 871, Masarykova univerzita Brno. ISBN 978-80-210-4852-2
- Sieg A. (2011) Capsule endoscopy compared with conventional colonoscopy for detection of colorectal neoplasms. *World J Gastrointest Endosc*, 2011, 16; p 81-85
- Suchánek Š., Barkmanová J., Frič P. (2011) Rakovina tlustého střeva a konečníku – prevence zabírá, pp. 35, Mladá fronta a. s. Praha. ISBN 978-80-204-2474-7
- Špičák J., Kovářová (2012) Pokroky ve screeningu kolorektálního karcinomu, *Postgraduální medicína* 6/ 2012; p 29
- Švestka T., Seifert B., Král N. (2013) Nové vyšetřovací metody pro prevenci kolorektálního karcinomu, *Medicína po promoci* 1/2013; p 4-11
- Tänzer M., Balluff B., Distler J., Hale K., Leodolter A., Röcken C., Molnar B., Schmid R., Lofton-Day C., Schuster T., Ebert M.P. (2010) Performance of epigenetic markers SEPT9 and ALX4 in plasma for detection of colorectal precancerous lesions. *PLoS One*. 2010; 5(2): e9061.
- Tóth K., Sipos F., Kalmár A., Pata A. V., Wichmann B., Stoehr R., Golcher H., Schellerer V., Tulassay Z., Molnár B. (2012) Detection of methylated SEPT9 in plasma is a reliable screening method for both left- and right-sided colon cancers. *Plos one* 7(9):e46000
- Vyzula Z., Žaloudík J. et al. (2007) Rakovina tlustého střeva a konečníku – vybrané kapitoly, pp. 287, Maxdorf. ISBN 978-80-7345-140-0.
- Warren J. D., Xiong W., Bunker A. M., Vaughn C. P., Furtado L. V., Roberts W. L., Fang J. C., Samowitz W. S., Heichman K. A. (2011) Septin 9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. *BMC Med*. 2011 Dec 14;9:133. doi: 10.1186/1741-7015-9-133
- Wasserkort R., Kalmar A., Valcz G., Spisak S., Krispin M., Toth K., Tulassay Z., Sledziewski A. Z., Molnar B. (2013) Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island. *BMC Cancer* 13:398.

Weiss G., Rösch T. (2010) Potential of a New Blood Test for Colorectal Cancer Screening –The Septin 9 Gene Biomarker. *European Oncology*, 2010;6(1):51-4.

Zavoral M. (2012) Diagnostika kolorektálního karcinomu, *Postgraduální medicína* 4/2012; p 409-413

Zavoral M., Frič P., Suchánek Š., Dušek L., Májek O., Sefert B. (2013) Národní program screeningu sporadického kolorektálního karcinomu (KR-CA): vývoj, současnost, perspektiva, *Lékařské listy* 1/2013; p 16-19

## **Použité internetové zdroje**

Dubská L., Nechvátal J. Kvantitativní stanovení hemoglobinu ve stolici, Laboratorní technologie dostupný na

<http://www.stapro.cz/bullfons/32009/labo1.pdf>; Staženo 25. 3. 2014

<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>

Kocna P.: Průkaz okultního krvácení ve stolici - FOBT - screening KRCA [online], poslední revize 3. 8. 2011, výukový portál 1. LF UK dostupný na

<http://dec53.lf1.cuni.cz/Kocna/elearning/ocult1.htm>; Staženo 29. 1. 2014

Tisková zpráva společnosti Genetics Home Reference A service of the U.S. National Library of medicine® (vydaná v září 2009) SEPT9; dostupné na

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/SEPT9> ; Staženo 23. 9. 2013.

Valík D., Nekulová M., Dubská L., Zima T., Springer D., Malbohan I., Topolčan O. (2008) Doporučení České společnosti klinické biochemie, České onkologické společnosti a České společnosti nukleární medicíny – sekce imunoanalytických metod k využití nádorových markerů v klinické praxi. Tisková zpráva společností *Masarykův onkologický ústav Brno, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN Praha, Centrální laboratoř pro imunoanalýzu LF UK a FN Plzeň* (vydaná 9. 9. 2008), dostupné na

[http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/TM/TM\\_dopor.pdf](http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/TM/TM_dopor.pdf); Staženo 9. 9. 2013

<http://www.kolorektum.cz>

<http://www.onkomajak.cz>

<http://www.svod.cz>