

Gaitada Gizli Kan Testlerinde Guaiak ve İmmunokimyasal Yöntemlerin Karşılaştırılması

The Comparison of Guaiac-Based and Immunochemical Methods for Fecal Occult Blood Screening

Emel Altekin

Ahmet Solak

Pınar Tuncel

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir

ÖZET

Gaitada gizli kanı araştıran testler, gizli gastrointestinal sistem kanamalarının taranmasında yaygın olarak kullanılan, tanısal açıdan değerli testlerdir. Guaiak testi gaitada gizli kanı tarama amaçlı geliştirilen yöntemler içinde en yaygın kullanılanı olmakla birlikte bu testin hatalı pozitif ve hatalı negatif sonuç verme oranları da oldukça yüksek bulunmuştur. Birçok sebze ve meyvede bulunan peroksidaz enzimi tarama testlerinde interferans yaratması sebebiyle problem oluşturmaktadır. Çalışmada öncelikle immunokimyasal yöntemin tekrarlanabilirliği değerlendirildi ve CV %2 olarak bulundu. Daha sonra her iki yöntemin duyarlılığını araştırmak için gaita örneklerine sitratlı tam kan örneği belli oranlarda dilüe edilerek eklendi ve testler çalışıldı. İmmunokimyasal yöntemle 0.06 mgHb/g feçes, Guaiak yöntemi ile 1.3 mgHb/g feçes ve üzerindeki konsantrasyonlarda hemoglobin içeren gaita örneklerinde pozitif sonuç elde edildi. İnterferans çalışmasında Guaiak testini interfere ettiği bilinen peroksidazdan zengin gıdaları kısıtlayan 6 günlük bir diyetle tabii tutulan gönüllüler ayrıca diyetin 4,5,6. günlerinde tedavi dozunda Fe⁺⁺ preparatı kullandılar ve alınan örneklerde her iki yöntemle gaitada gizli kan testi çalışıldı. Yapılan diyet kısıtlaması sonucunda Guaiak yöntemi ile iki gönüllüden alınan örnekler pozitif sonuç verirken, immunokimyasal metotla 5 gönüllünün örneği de negatif olarak sonuçlandı. Fe⁺⁺ preparatı kullanımı sonucunda guaiak testinde bir örnek pozitif sonuçlanırken, immunokimyasal yöntemde tüm sonuçlar negatif olarak elde edildi. Peroksidaz interferansının etkisini direkt olarak saptamak amacı ile 0.05 mg ile 5 mg arasındaki konsantrasyonlarda peroksidaz çözeltisinin gaita örneklerine eklendiği çalışmada Guaiak testinde 0.1 mg/g feçese ve daha yüksek konsantrasyonda peroksidaz içeren örneklerde pozitif sonuç elde edilirken immunokimyasal yöntemde tüm konsantrasyonlarda negatif sonuç elde edildi.

Anahtar Sözcükler: Gaitada gizli kan, Guaiak Testi, İmmunokimyasal yöntem

ABSTRACT

Screening for fecal occult blood has been shown to be effective in reducing the colorectal cancer mortality. Guaiac-based tests are one of the most frequently used screening tests, but their false positivity and negativity rates are quite high. Peroxidase enzyme, found in many fruits and vegetables causes a positive interference with the method. Immunochemical methods which utilize the

antibodies against human hemoglobin are devoid of these interferences. In this study, we first evaluated the within-run precision of the immunochemical method and found CV as 2%. Then, to evaluate the sensitivity of the methods we added human blood at serial dilutions to obtain decreasing amounts of hemoglobin. We obtained positive results at 0.06 mg Hb/g feces in immunochemical method and at 1.3 mg Hb/g feces in guaiac method. Then 5 volunteers were kept on a diet free of meat, fish and peroxidase containing vegetables for 6 days and on 4, 5 and 6th days they took Fe⁺⁺ tablets at therapeutic doses. The specimens obtained on 3rd and 6th days were analyzed by both methods. 2 of the specimens obtained on the 3rd day were positive with guaiac test and all were negative with immunochemical method. The use of iron interfered in one specimen with guaiac test, but in none with immunochemical method. To evaluate the peroxidase interference, we added horse-radish peroxidase at concentrations from 0.05 mg/g feces to 5 mg/g feces. While there was no interference in immunochemical method, in guaiac method we obtained positive results in specimens containing 0.1 mg and more peroxidase per g feces.

Key Words: Fecal occult blood, Guaiac method, Immunochemical method

GİRİŞ

Gaitada gizli kan taraması, gastrointestinal sistemde olan ülsere lezyonların değerlendirilmesinde tanısız açıdan önemli bir testtir. Bu testlerin erken tanı olanağı sağlayarak kolorektal kanserlere bağlı mortalite oranını düşürdüğü çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (1,2). Gaitada gizli kan araştırılmasında kullanılan yöntemler, radyoaktif, fiziksel, immunokimyasal ve kimyasal yöntemler olmak üzere dört ana kategoride toplanabilirler. Radyoaktif yöntem, radyoaktif maddenin intravenöz enjeksiyonunu takiben gaitanın radyoaktivitesinin ölçümü prensibine dayanır. Fiziksel yöntem gaitanın eritrositler ve hematin kristalleri yönünden mikroskopik incelenmesi temeline dayanır. Gaitadaki hem fraksiyonunun yalancı peroksidaz aktivitesine dayanan kimyasal yöntem ve lateks aglütinasyon teknolojisini kullanan immunokimyasal yöntem kullanımı daha pratik olan ve daha sık olarak kullanılan yöntemlerdir. Kimyasal yöntemlerden biri olan guaiac yöntemi oldukça yaygın kullanılan bir yöntem olmakla birlikte, yanlış pozitif ve yanlış negatiflik oranları da oldukça yüksektir. Birçok sebze ve meyvede bulunan peroksidaz enzimi bu yöntem ile interferans yaratması sebebiyle problem oluşturmakta ve test öncesi sıkı bir diyet kısıtlamasını beraberinde getirmektedir. Bu nedenle, immunokimyasal yöntemin diyet kısıtlaması gerektirmeyen, uygulanabilirliği kolay, sensitivitesi yüksek bir test olarak giderek kulla-

nımı yaygınlaşmaktadır. Bu çalışmada, iki yöntem karşılaştırılarak özellikle analitik duyarlılık ve interferansa neden olan faktörler açısından değerlendirilmeleri amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Yöntemler

Guaiac Yöntemi: Eritrositler içinde bulunan hemoglobinin hem fraksiyonu, yapısal olarak bitkilerde bulunan peroksidaza benzerdir. Test, hidrojen peroksidin hemoglobin ve türevleri tarafından katalitik olarak parçalanması sonucunda ortamda renksiz olarak bulunan oksijen alıcısı bileşiğin renkli guinon bileşiğine dönüşmesi prensibine dayanmaktadır.

İmmunokimyasal Yöntem: Test, lateks aglütinasyon teknolojisini kullanmaktadır. İnsan hemoglobinine karşı meydana gelmiş antikorlarla kaplı lateks partiküllerinin hemoglobin ile oluşturdukları aglütinasyonun turbiditede ortaya çıkardığı değişiklik saptanarak gaitadaki kan miktarı kantite edilmektedir. Yöntem değerlendirme çalışmalarında OC-Sensor-µ® tam otomatik gaitada gizli kan analizörü (Alfa Wassermann, İtalya) kullanıldı ve sonuçlar ng/mL olarak ifade edildi. Firmanın önerisi ile 100 ng/mL üzeri değerler pozitif olarak kabul edildi.

Değerlendirme Çalışmaları

Tekrarlanabilirlik Çalışması: Bu çalışmada aynı gaita örneğinin aynı çalışma içinde 10

kez ard arda immunokimyasal yöntem ile çalışılması ile yöntemin çalışma-içi tekrarlanabilirliği değerlendirildi.

Duyarlılık Çalışması: 1 mL'de 0.13 g Hb içeren sitratlı tam kan dilüe edilerek gaitaya eklendi ve konsantrasyonları 6.5, 3.2, 1.3, 1.13, 0.3, 0.13, 0.06 ve 0.03 mg Hb/g feçes olacak şekilde gaita örnekleri hazırlandı. Örnekler her iki yöntem ile çalışıldı.

İnterferans Çalışmaları: Çalışmaya 25-35 yaşlar arasında yazılı onayları alınmış 5 gönüllü dahil edildi. Gönüllüler guaiak testini interfere ettiği bilinen peroksidaz içeriği zengin sebzeleri ve hem içeriği yüksek et türü gıdaları yasaklayan 6 günlük bir diyet tabi tutuldular. Diyetin 3. günü sonunda alınan gaita örneklerinde her iki yöntemle gizli kan testi çalışıldı.

Diyetin 4., 5. ve 6. günlerinde tedavi dozunda (550 mg/gün) Fe⁺⁺ preparatı (Gyno Tardiferon tablet) 2x1/gün oral olarak kullanıldı. 6. gün sonunda tekrar gaita örnekleri alınarak her iki yöntemle çalışıldı.

Peroksidazın yöntemler üzerine interferansını araştırmak amacıyla bitki peroksidazı (horse-radish peroksidase) ekstraktı 20mg/mL ve 5 mg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde distile su ile çözülerek stok çözeltiler elde edildi. Bu stok çözeltiler eklenerek 5.0, 4.0, 3.0, 2.5, 2.0, 1.0, 0.3, 0.2, 0.1 ve

0.05 mg peroksidaz/g feçes içeren gaita örnekleri hazırlandı ve örnekler her iki yöntemle çalışıldı.

Tüm çalışmalarda örnekler 2 kez çalışılarak sonuçları değerlendirildi.

BULGULAR

Tekrarlanabilirlik Çalışması: Yapılan çalışmada CV %2 olarak bulundu.

Duyarlılık Çalışması: Tam kan eklenen gaita örnekleri immunokimyasal yöntem ile çalışıldığında 0.03 mg Hb içeren gaita örneklerinde (-), diğer tüm konsantrasyonlardaki örneklerde (+) sonuç elde edildi. Guaiak yöntemi ile yapılan çalışmada 6.5, 3.2 ve 1.3 mg Hb içeren örnekler (+), 0.65 mg Hb içeren örnekler şüpheli (+), 0.3 mg Hb ve daha düşük konsantrasyonlarda Hb içeren örnekler (-) olarak sonuçlandı (Tablo 1).

İnterferans Çalışmaları: Yapılan çalışmada, 5 gönüllüden 6 günlük diyetin 3. günü sonunda alınan gaita örneklerinde 2 kişide guaiak metoduyla (+) sonuç saptanırken, immunokimyasal yöntem ile 5 örnekte de (-) sonuç elde edildi.

Fe⁺⁺ preparatının kullanımı sonunda guaiak testi ile bir gönüllünün örneği (+) olarak saptanırken, diğer 4 gönüllünün örnekleri (-) olarak bulundu.

Tablo 1. Duyarlılık değerlendirmesi.

Hemoglobin (Hb) (mg/g feçes)	6.5	3.2	1.3	0.65	0.3	0.13	0.06	0.03
İmmunokimyasal yöntem	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
Guaiak yöntemi	(+)	(+)	(+)	Şüpheli (-)	(+)	(-)	(-)	(-)

Tablo 2. Peroksidaz interferansı değerlendirmesi.

Peroksidaz (mg/g feçes)	5	4	3	2.5	2	1	0.5	0.2	0.1	0.05
İmmunokimyasal yöntem	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Guaiak yöntemi	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	Şüpheli (-)	(+)

İmmunokimyasal yöntem ile 5 gönüllüden alınan örneklerin tümü (-) sonuç verdi.

Farklı konsantrasyonlarda peroksidaz çözeltisi içeren örneklerin tümünde immunokimyasal yöntem ile (-) sonuç elde edildi. Guaiak testi ile ise 0.1 mg/g feçes içeren örnek şüpheli (+), 0.05 mg peroksidaz/g feçes içeren örnek ise (-) olarak saptandı. Daha yüksek konsantrasyonlarda peroksidaz içeren örneklerin tümünde (+) sonuç elde edildi (Tablo 2).

TARTIŞMA

Gaitada gizli kan araştırılması, gastrointestinal hastalıkların tanısında, kolorektal kanserlerin erken teşhisinde değerli bir test olması nedeniyle tarama amaçlı bir çok yöntem geliştirilmiştir. Radyoaktif maddenin intravenöz enjeksiyonunu takiben gaitanın radyoaktivitesinin ölçümü prensibine dayanan radyoaktif yöntem, hasta açısından zahmetli, rutin kullanım için oldukça komplikedir. Gaitanın eritrositler ve hematin kristalleri yönünden mikroskopik incelenmesi ise mesleki deneyim gerektiren, zaman alıcı bir yöntemdir. Kimyasal ve immunokimyasal metodlar değerlendirmesi hızlı ve basit, uygulanabilirlik açısından pratik metodlardır. Kimyasal bir yöntem olan guaiak metodunun insan hemoglobine spesifik olmayışı, ortamda insan hemoglobininin farklı hemoglobinin veya sebze tüketimi sonucu peroksidaz enziminin varlığına bağlı yalancı pozitiflik oranının yüksek oluşu kullanımına kısıtlılıklar getirmektedir (5).

Brokoli, domates, lahana, turp, salatalık, kavun, şalgam peroksidazdan zengin sebzelerdir. Et türü hayvansal gıdalardaki hem içeriği ise oldukça yüksektir. Günlük yaşamda bu tür gıdaların kullanım sıklığı göz önüne alındığında Guaiak metodu hastanın beslenme alışkanlığını değiştirmesini gerektiren sıkı bir diyet zorunluluğunu beraberinde getirmektedir (6). Çalışmamızda diyet sonrası alınan gaita örneklerinde 2 kişide pozitif sonuç elde edilmesi, bu kişilerin diyet kısıtlamasına yeterli özeni göstermemiş olduğunu düşündürmekte ve gönüllülerin entelektüel düzeylerinin yüksek, konuyu bilen sağlık

personeli olmalarına rağmen diyeti gerçekleştirmenin zorluğunu göstermektedir. Peroksidaz çözeltisini gaita örneklerine değişik konsantrasyonlarda ekleyerek yaptığımız çalışmada 0.1 mg/g feçes konsantrasyonuna kadar guaiak metoduyla pozitif sonuç elde edilirken, immunokimyasal metodun negatif sonuçlanması Guaiak testinin peroksidazdan zengin gıdalara sıkı bir kısıtlama gerektirdiğini doğrulamaktadır. Bu durum testin pozitif sonuçlanması durumunda tanı açısından güvensizlik yaratmakta ve testin tekrarlanma ihtiyacını yaratmaktadır. Ayrıca testin sensitivitesinin düşük olmasından kaynaklanan (7) yanlış negatiflik oranını en aza indirmek amacıyla 6 günlük bir diyetin son 3 gününde, gaita örneğinin ardışık olarak 3 gün üst üste alınması gerekmektedir. Bu, hasta açısından sıkıntılı, testin değerlendirilmesi açısından zaman kaybına yol açan bir durumdur. Gönüllülere tedavi dozunda demir uygulandığında, bir kişide Guaiak testiyle pozitif sonuç elde edilip, immunokimyasal yöntem ile beş kişide de negatif sonuç elde edilmesi, demir preparatı kullanan hastalarda Guaiak yöntemi ile gaitada gizli kan testi yapılmasının sakınca oluşturduğu, immunokimyasal yöntemde ise hemoglobine spesifik antikor kullanımının bu sakıncayı ortadan kaldırdığını kanıtlamaktadır. Gerek duyarlılığın düşüklüğünden gerekse de yanlış pozitiflik ve negatiflik olasılıklarının yarattığı testin tekrarlanma ihtiyacı ise maliyeti arttıran bir durumdur.

Guaiak testi immunokimyasal metoda göre sensitivitesi daha düşük bir test olmakla beraber hem fraksiyonuna spesifik bir reaksiyon olması nedeniyle üst gastrointestinal sistem kanamalarının değerlendirilmesinde tanısal açıdan sorun yaratmamaktadır. İmmunokimyasal yöntemin ise hemoglobine spesifik oluşu bir yandan interferans açısından yarar sağlarken, diğer taraftan bu durum, gastrointestinal enzimlerin hemoglobinde oluşturduğu yapısal değişiklik nedeniyle üst gastrointestinal sistem kanamalarında tanısal yararlılığı düşürmektedir (8). Sigmoidoskopi taramalarının kolorektal kanserlerde

erken tanı olanağı sağlayarak mortalite oranını düşürdüğü bilinmekle birlikte (9), bu prosedürün proksimal kolon kanserlerini detekte etmekte yetersiz kaldığı bildirilmiştir (10). Bir olgu-kontrol çalışmasında immünokimyasal metodla bir yıl ve iki yıl süre ile belli aralarla tarama testine tabi tutulanların, tarama yapılmayanlara göre kolorektal kanser mortalite oranlarında %60 azalma tespit edilmiştir (11). Bu şartlar altında uygulanabilirliğindeki kolaylıklar göz önüne alınırsa non-invaziv bir test olan immünokimyasal metodla gaitada gizli kan tarama testi tanınasal açıdan değerli bir test olarak yerini almaktadır. Tarama amaçlı immünokimyasal metodu kullanarak yapılan 5 yıllık popülasyon çalışmasında, hasta grubunun %46'sı rektum, %15'i sigmoid kolon, %4'ü inen kolon, %14'ü transver kolon, %21 çıkan kolon çekum kanserinden oluşmaktaydı. Taramanın yapıldığı 5 yıllık süre içinde tanısı konup, 1-5 yıllık periyot içinde ölenlerin oranı, tarama yapılmayanlarla karşılaştırıldığında immünokimyasal yöntemin mortalite riskini %23-60 oranında değişen bir oranla azalttığı ortaya konmuştur (12). Yaptığımız duyarlılık çalışmasında, düşük konsantrasyonda kan içeren gaita örneklerinde immünokimyasal yöntemle pozitif sonuç elde edilmesi bir tarama testi olarak testin tanınasal duyarlılığını ortaya koyan diğer çalışmaları desteklemektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızın verileri, Guaiak testi kullanımı sırasında gerekli diyet ve ilaç kısıtlamalarının immünokimyasal yöntem için gerekli olmadığını göstermektedir.

İmmünokimyasal yöntem Guaiak testine göre maliyeti daha yüksek bir test olmasına rağmen duyarlılığı daha yüksek bir test olması, hastanın beslenme ve ilaç düzenini bozmadan testi uygulama olanağı sağlaması ayrıca örnek kaplarının kullanışlı olması ve kısa zamanda bir çok örneğin çalışılmasına olanak sağlaması nedeniyle birçok açıdan guaiak metoduna göre avantajlı görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Young GP, St John DJ, Winawer SJ, Rozen P. Choice of fecal occult blood tests for colorectal cancer screening: recommendations based on

performance characteristics in population studies: WHO (World Health Organization) and OMED (World Organization for Digestive Endoscopy) report. *Am J Gastroenterol* 2002; 97 (10): 2499-2507.

2. Nakama H, Yamamoto M, Kamijo N, Li T, Wei N, Fattah AS, Zhang B. Colonoscopic evaluation of immunochemical fecal occult blood test for detection of colorectal neoplasia. *Hepatogastroenterology* 1999; 46(25): 228-31.
3. Syed A, Khatoon B, Silwadi M. New reagents for detection of fecal occult blood. *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2001; 24: 581-586.
4. Cole SR, Young GP. Effect of dietary restriction on participation in fecal occult blood test screening for colorectal cancer. *Med J Aust* 2001; 175(4): 195-198.
5. Gastroenterology Section, Minneapolis Veterans Affairs Medical Center, and University of Minnesota, USA. Fecal occult blood tests in occult gastrointestinal bleeding. *Semi Gastrointest Dis* 1999; 10: 48-52.
6. Caligiore P, Macrae F, Rayner LJ, Legge JW. Peroxidase levels in food: relevance to colorectal cancer screening. *J Clin Nutr* 1982; 35: 1487-1489.
7. Rozen P, Knaani J, Samuel Z. Comparative screening with a sensitive Guaiac and Specific Immunochemical occult blood test in an endoscopic study. *American Cancer Society* 2000; 89: 46-51.
8. Gopalswamy N, Stelling HP, Market RJ, Maimon HN et al. A comparative study of eight fecal occult blood tests and HemoQuant in patients in whom colonoscopy is indicated. *Arch Fam Med* 1994; 3 (12): 1043-1048.
9. Saito H. Screening for colorectal cancer: current status in Japan. *Dis Colon Rectum* 2000; 43(10 suppl): 78-84.
10. Robinson MH, Berry DP, Vellactt KD, Moshakis V, Hardcastle JD. Screening for colorectal cancer. *Lancet* 1993; 342: 241-242.
11. Selby JV, Fredman GD, Quesenberry CP, Weiss NS. Effect of fecal occult blood testing on mortality from colorectal cancer. A case-control study. *Ann Int Med* 1993; 118: 1-6.
12. Saito H, Soma Y, Koeda J, Wada T, et al. Reduction in risk of mortality from colorectal cancer by fecal occult blood screening with immunochemical hemagglutination test. A case-control study. *Int J Cancer* 1995; 61: 465-469.

Yazışma adresi:

Dr. Emel Altekin
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
35340- İnciraltı, İzmir