

# Kvantitativní stanovení hemoglobinu ve stolici - preanalytické a analytické aspekty

Kocna P.

Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. Lékařské fakulty Karlovy University  
a Všeobecné fakultní nemocnice, Praha

## SOUHRN

Preanalytické a analytické aspekty kvantitativní metody stanovení hemoglobinu ve stolici mají podstatný význam na vyhodnocení testu, jehož pozitivita je indikací ke kolonoskopii při screeningu kolorektálních nádorů. Požadavky na kvalitu laboratorní analýzy vyžadují podle normy ČSN EN ISO 15189, aby byla hodnocena variabilita ve všech fázích procesu zkoušky. Preanalytickým aspektem je odběr a transport vzorku zahrnující odběrovou kazetu (množství stolice, objem a složení extrakčního pufru), konzistenci stolice, stabilitu vzorku (doba a teplota transportu). Analytickým aspektem je především variabilita imunochemické technologie, rozdílné protilátky, pufrů, standardy a kalibrace analyzátorů. Harmonizace a standardizace stanovení hemoglobinu ve vzorcích stolice je tématem pracovní skupiny IFCC - WG-FIT (Working Group for Faecal Immunochemical Testing).

*Klíčová slova:* kolorektální karcinom, screening, stanovení okultního krvácení, imunochemická detekce hemoglobinu ve stolici, analytická a preanalytická variabilita.

## SUMMARY

### Kocna P.: Quantitative determination of hemoglobin in stool - preanalytical and analytical aspects

Preanalytical and analytical aspects of the quantitative method for the determination of haemoglobin in stool are essential for the evaluation of the test, the positivity of which is an indication for colonoscopy in the screening of colorectal tumors. The quality requirements for laboratory analysis require, according to standard ISO 15189, that variability be assessed at all stages of the test process. The pre-analytical aspect is the collection and transport of the sample including the collection cassette (amount of stool, volume and composition of the extraction buffer), stool consistency, stability of the sample (time and temperature of transport). The analytical aspect is mainly the variability of immunochemical technology, different antibodies, buffers, standards and calibration of analysers. Harmonization and standardization of hemoglobin determination in stool samples is the topic of the IFCC Working Group for Faecal Immunochemical Testing (WG-FIT).

*Keywords:* colorectal cancer, screening, determination of occult bleeding, immunochemical detection of hemoglobin in stool, analytical and preanalytical variability.

## Úvod

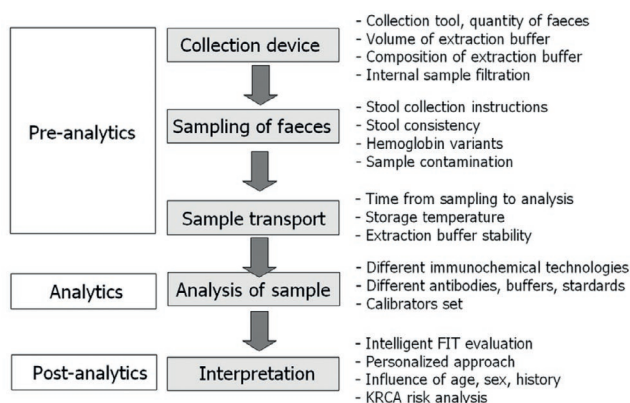
Kolorektální karcinom (KRCA) je třetí nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu na celém světě a předpokládá se, že počet případů vzroste z 1,850 milionů nyní na 3,093 milionu v roce 2040 [1]. KRCA je jedním z nejvíce preventabilních karcinomů, a screeningové programy vedou k významnému snížení úmrtnosti na KRCA. Optimalizací screeningu se zabývá většina zemí a zahrnuje řadu důležitých aspektů, jako je místní infrastruktura zdravotní péče, dostupnost lékařských zdrojů, incidence KRCA a kvalita screeningových procesů. V České republice se screening KRCA provádí buď v jednom nebo ve dvou krocích. Dvoustupňové programy vyžadují před kolonoskopií pozitivní test na okultní krvácení ve stolici - FIT (Faecal Immunochemical Test). Kvantitativní imunochemická detekce hemoglobinu ve stolici ve většině zemí již nahradila dříve používaný guajakový test (g-FOBT). Úhrada ze zdravotního pojištění vyžaduje od ledna 2020 provedení FIT pouze kvantitativní analýzou hemoglobinu ve stolici provedené na přístroji v režimu POCT nebo laboratorním analyzátozem s limitem

detekce 15 µg/g stolice a požadavkem je zapojení do systému externí kontroly kvality [2].

Kvantitativní imunochemická detekce hemoglobinu ve stolici nabízí mnohem širší využití při screeningu, a to nejen u asymptomatických jedinců s průměrným rizikem, ale FIT lze použít v primární péči a může se stát nedílnou součástí hodnocení všech pacientů s gastroenterologickou symptomatologií v primární péči [3, 4]. Významné jsou nejen pozitivní hodnoty, nad definovanou cut-off indikující kolonoskopii, ale rovněž hodnoty nižší - negativní. Po osmi letech sledování měli účastníci s výchozími koncentracemi hemoglobinu 8-10 µg/g vyšší kumulativní výskyt pokročilých neoplázií (33 %) než účastníci s nulovou hodnotou hemoglobinu - 5 % ( $p < 0,001$ ) a účastníci se dvěma po sobě následujícími koncentracemi 8-10 µg/g měli 14násobné zvýšení rizika pokročilé neoplázie ve srovnání s účastníky se dvěma po sobě jdoucími nulovými koncentracemi hemoglobinu ve stolici ( $p < 0,001$ ) [5]. Kumulativní součet dvou po sobě následujících negativních FIT s výsledkem nad 20 µg/g stolice výrazně zvyšuje záchyt pokročilých neoplázií [6]. Inteligentní vyhodnocování FIT indikující kolonoskopii a především nízkých hodnot FIT

předpokládá velmi přesnou analýzu a vyžaduje, aby lékaři získali mnohem hlubší znalosti o preanalytických a analytických podmínkách pro stanovení Hb ve stolici (obr. 1). Podstatným aspektem jsou znalosti konkrétního analyzátoru, jeho limity detekce (LoD), limity kvantifikace (LoQ) [7] a zajištění externí kontroly kvality [8].

Významným preanalytickým vlivem je odběr a transport vzorku stolice, analytická variabilita je dána technologií imunoanalytického stanovení (rozdílné protilátky, pufrů, kalibrace systému). Problematika variability stanovení markerů ve stolici z pohledu preanalytiky a imunochemické analytiky je řešena velmi detailně nejen pro hemoglobin [9], ale také pro stanovení kalprotektinu [10]. Harmonizace a standardizace stanovení hemoglobinu ve vzorcích stolice je tématem pracovní skupiny IFCC - WG-FIT (Working Group for Fecal Immunochemical Testing) [11].



**Fig 1:** Overview of pre-analytical, analytical and post-analytical variables associated with the quantitative determination of haemoglobin in stool.

## Vyjádřování koncentrace Hb ve stolici

Prvním krokem ve standardizaci FIT byla změna jednotek pro vyjádření výsledku z ng/mL - odpovídající

koncentraci ve vzorkovacím pufru na  $\mu\text{g/g}$  stolice, což eliminuje variabilitu vzorkovacích kazet [12]. Odběrové kazety pro jednotlivé laboratorní analyzátoři se liší v objemu extrakčního pufru a množství odebírané stolice více než 10x (Tabulka 1). Expertní skupina WEO (World Endoscopy Organization) pro screening KRCA navrhla v roce 2012 [13] jednoduchou strategii pro vyjadřování koncentrace Hb ve stolici přepočítáním hodnoty na koncentraci v  $\mu\text{g/g}$  stolice, které umožní srovnávat FIT testy provedené s rozdílnou odběrovou kazetou, a která je dnes již většinou akceptována.

Diskutována je pouze otázka, zda by pomocí převodu na objem stolice, nikoli na její hmotnost, nebyly získány ještě přesnější výsledky [9]. Studie prokazuje rozdíl mezi výrobcí deklarovanou hodnotou a metrologicky ověřenou hmotností odebrané stolice v rozsahu od 56 % do 121 %. Nicméně relativní hustota stolice je obvykle blízká 1,00, takže doporučený převod na koncentraci Hb v  $\mu\text{g/g}$  stolice umožňuje racionální hodnocení FIT.

Česká společnost klinické biochemie (ČSKB) v roce 2015 doporučila z hlediska kvality a vyhodnocování péče o pacienty a epidemiologické srovnatelnosti výsledků, prováděných v České republice jednotný postup - stanovení okultního krvácení ve stolici provádět výhradně kvantitativními FIT testy a výsledky vyjadřovat koncentrací Hb ve stolici, v jednotkách  $\mu\text{g/g}$  stolice [14, 15].

## Odběr stolice a transport vzorku

Odběr vzorku stolice a jeho transport do laboratoře zahrnuje výrazné riziko preanalytické chyby. Návody - pokyny na provedení odběru vzorku stolice se značně liší mezi devíti testovanými výrobci odběrových zkumavek a zahrnují tři klíčové komponenty:

- počet vložených odběrových tyčinek do vzorku stolice
- vizuální kontrola zářezů odběrové tyčinky pro úplné naplnění stolicí
- jednorázové zasunutí odběrové tyčinky naplněné stolicí do zkumavky. Porušení pokynů k odběru vzorků

**Table 1.** Variability of sampling cartridges for laboratory and POCT analyzers the quantitative determination of hemoglobin in faeces.

Analyser	Manufacture	Analytical principle	Sample weight (mg)	Buffer volume (mL)	Conversion factor
<b>OC Sensor</b>	Eiken Chemical	latex immunotubidimetry	10	2	0.2
<b>Sentifit</b>	Sentinel CH Spa.	latex immunotubidimetry	10	1.7	0.17
<b>FOBIT FWIII</b>	Fujifilm, Wako.	colloidal gold colorimetry	4	1	0.25
<b>HM-Jack</b>	Kyowa Medex	latex immunotubidimetry	2	2	1
<b>NS Plus</b>	Alfresa Pharm	colloidal gold immunoturbidimetry	10	1.9	0.19
<b>Kroma iT</b>	Linear Chemicals	latex immunotubidimetry	20	1.6	0.08
<b>FOB Turbilatex</b>	CerTest Biotec	latex immunotubidimetry	20	2	0.1
<b>QuickRead Go</b>	Aidian	immunotubidimetry	10	2	0.2
<b>Standard F</b>	SD Biosensor	immunofluorescence	10	2	0.2
<b>Spin 120</b>	Spinreact	latex immunotubidimetry	17	1.7	0.1
<b>iChroma</b>	Boditech Med	immunofluorescence	10	1	0.1

stolice může vést k nezanedbatelnému ovlivnění následujícího měření koncentrace hemoglobinu ve stolici. Nedodržení podmínek a) a b) dochází k variabilnímu snížení výsledné hodnoty, efekt na diagnostický přínos je relativně nízký. Nedodržení podmínky c) - přeplnění odběrové zkumavky vede k podstatnému nadhodnocení naměřené koncentrace hemoglobinu [16, 17]. Variabilita pokynů k odběru vzorku stolice uváděná v našich, českých laboratořích, často překladem z anglických originálů, je uvedena v Příloze 1. Váha odebraného vzorku a způsob odběru byly testovány na čtyřech nejpožívanějších analyzátořech - HM-JACKarc/Kyowa, OC-sensor DIANA/Eiken, SENTIFIT 270/Sentinel a NS-Prime/Alfresa a výsledná hodnota koncentrace hemoglobinu nebyla signifikantně ovlivněna váhou odebraného vzorku stolice, protože odběrové zkumavky uvedených analyzátořů mají integrované septum zachycující nadbytečnou stolici [18].

Preanalytickým aspektem, který může ovlivnit výsledek FIT, mohou být varianty lidského hemoglobinu. Imunochemické testy pro FIT používají k detekci krve ve vzorcích stolice polyklonální protilátky vytvořené na globinovou část lidského hemoglobinu. Lidský dospělý Hb je tvořen čtyřmi globinovými řetězci, dvěma alfa-řetězci a dvěma beta-řetězci. Tato struktura může být ovlivněna řadou poruch charakterizovaných syntézou abnormálního globinového řetězce (varianty Hb), sníženou syntézou jednoho nebo více globinových řetězců (thalasemie) nebo jejich kombinací. Je důležité si uvědomit, že existuje více než 1700 různých identifikovaných variant Hb [19], a uvedená studie zkoumala pouze 20 nejčastěji se vyskytujících variant Hb v současné populaci (HbF, HbC, HbD, HbE, HbS, varianty při  $\beta$ -talasémii major, srpkovité anémii). FIT byl vyhodnocen na čtyřech analyzátořech - HM-JACKarc/Kyowa, OC-sensor Pledia/Eiken, SENTIFIT 270/Sentinel a NS-Prime/Alfresa. Tři varianty hemoglobinu (Hb při  $\beta$ -talasémii major a dva vzorky fetální pupečnickové krve) vykazovaly pouze 50% hodnotu FIT ve srovnání s očekávanou pro všechny čtyři testované analyzátoře [20].

Molekula hemoglobinu je sférického tvaru a skládá se ze čtyř podjednotek. Každá podjednotka je tvořena bílkovinnou částí - globinem a prostetickou (nebílkovinnou) částí - hemem - tvořené tetrapyrrolovým kruhem (protoporfyrin IX) s centrálním atomem železa. Stanovení okultního krvácení ve stolici založené na gujakové pryskyřici detekovalo hem, který je výrazně termostabilnější než bílkovinný globin. Detekci krvácení v horní části zažívacího traktu nelze metodou FIT, na rozdíl od gujakového FOBT, prokazovat. Degradaci hemoglobinu během střevní pasáže může docházet k falešné FIT negativitě u proximálních lézí a navrženým řešením je kombinovaná detekce hemoglobinu s termostabilnějším transferinem. Pozitivita kombinovaného testu 10,1 %, oproti 6,7 % pro hemoglobin byla vyšší především u žen s konstipací [21]. Preanalytickým faktorem je proto kombinace teploty a času transportu vzorku stolice. Stabilitu hemoglobinu v extrakčním pufru výrobcí odběrových kazet stále zvyšují [22,23], a při transportu do laboratoře (průměrná doba do analýzy je 6 dní) klesá

senzitivita FIT pro detekci pokročilých neoplazií (cut-off 15  $\mu\text{g/g}$ ) z hodnoty 50,8 % při teplotě  $< 10^\circ\text{C}$  na 42,4 % při 10 až  $19^\circ\text{C}$  a 40,0 % při 20 až  $24^\circ\text{C}$  [24]. Nejvyšší stabilita testovaná pro kvantitativní analyzátoře NS Plus - OC Diana byla v rozmezí 32 až 60 dnů (pokles koncentrace Hb do 20 % výchozí hodnoty) při teplotě 2 až  $8^\circ\text{C}$ , zmrazení a rozmrazení stabilitu snížilo, při uchování v pokojové teplotě 20 až  $22^\circ\text{C}$  je stabilita pouze 3 až 7 dnů a při zvýšené teplotě  $45^\circ\text{C}$  je stabilita téměř nulová 0 až 1 den [25]. Vzorky stolice uchovávané v laboratoři při teplotě  $5^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$  a nebo  $35^\circ\text{C}$  po dobu 1 až 7 dnů byly analyzovány 10 kvantitativními analyzátoři laboratorními i POCT. Signifikantní pokles koncentrace Hb a pozitivita testu byl prokázán pro několik analyzátořů již během čtyř dnů [26]. Inverzní sinusoidu mezi průměrnou denní teplotou a pozitivitou FIT demonstruje sedmiletá studie na souboru 510 922 nemocných s 1 429 089 FIT vzorky, které byly analyzovány do tří dnů na systému OC-Diana. Průměrná denní teplota je v rozmezí 0 až  $32^\circ\text{C}$  a senzitivita FIT je 2,6 % až 8,0 % (medián 4,4 %). Inverzní sinusoidu vykazuje nejnižší FIT senzitivitu během letních měsíců při nejvyšších denních teplotách [27].

## Variabilita imunochemických analyzátořů

Kvantitativní analýza hemoglobinu ve stolici je řešena pomocí laboratorních i POCT analyzátořů. Variabilita zahrnuje různé analytické technologie, použité protilátky, pufrы a kalibrátory. Analytickou evaluaci čtyř analyzátořů pro kvantitativní stanovení Hb ve stolici (HM-JACKarc, NS-Prime, OC-sensor PLEDIA a SENTIFIT 270) zahrnující např. limity detekce (LoD), limity kvantifikace (LoQ), linearitu, efekt hook/prozone popisuje studie z NHS Bowel Cancer Screening Programme Southern Hub v Guildfordu - England [28]. Výsledná hodnota FIT analýzy je kritériem indikujícím kolonoskopii při screeningu KRCA. Rozdílná pozitivita FIT ve vztahu k technologii analytického procesu je podrobně popsána v německé studii [29] porovnávající devět různých kvantitativních metod pro stanovení hemoglobinu ve stolici. Autoři porovnali tři varianty pro stanovení cut-off kritéria. Pozitivita testu je 6,8 %; 6,2 %; 12,3 %; 6,8 %; a 5,7 % pokud je nastavena mezní hodnota cut-off podle doporučení výrobce - OC-sensor 10  $\mu\text{g/g}$ , SENTIFIT FOB Gold 17  $\mu\text{g/g}$ , CAREprime Hb 6,3  $\mu\text{g/g}$ , QuikRead Go iFOBT 15  $\mu\text{g/g}$  a test Eurolyser FOB 8,04  $\mu\text{g/g}$ . Při shodně nastaveném cut-off na 15  $\mu\text{g/g}$ , tj. hodnota doporučená nyní pro screening v České republice, bude pozitivita pro tyto analyzátoře 3,4 %; 6,6 %; 5,6 %; 5,9 % a 4,0 %. Optimálním řešením je nastavit cut-off tak, aby byla zjištěna shodná specifita testu 96,7 %, pozitivita je téměř identická v rozmezí 5,9 % - 6,1 %. Odpovídají cut-off pro uvedené analyzátoře - OC-sensor 6,6  $\mu\text{g/g}$ , SENTIFIT-FOB Gold 17,68  $\mu\text{g/g}$ , CAREprime Hb 12,35  $\mu\text{g/g}$ , QuikRead Go iFOBT 15  $\mu\text{g/g}$  a Eurolyser FOB test 6,11  $\mu\text{g/g}$ .

Vzhledem k uvedené variabilitě nelze mezní kritéria stanovená metodou jednoho výrobce použít na výsledky získané metodou jiného výrobce. Kritérium cut-off 15  $\mu\text{g/g}$  stolice bylo v Nizozemsku zvoleno na základě

mnoha studií provedených s analyzátozem OC-sensor a očekávaná pozitivita měla být 6,3 %. Screening KRCA se však provádí testem FOB Gold, který byl vybrán pro populační screening v Nizozemsku na základě výběrového řízení, skutečná pozitivita po jednom roce (12,2 %) významně zvýšila potřebu kolonoskopií a vedla k nezbytnému zvýšení cut-off hodnoty na 47 µg/g z hodnoty 15 µg/g, při současném snížení citlivosti metody a positivity testu na očekávaných 6,3 % [30]. Na zasedání výboru pro screening WEO CRC v Barceloně porovnávala Lansdorp-Vogelaar variantu neúčinnějšího screeningu (FIT ročně, 45 - 80 let, 10 µg/g) s aktuálně prováděným screeninem (FIT jednou za 2 roky, 55 - 75 let, 47 µg/g), odpovídající jedné třetině účinku ve srovnání s neúčinnějším screeninem [31]. Výrobce testu FOB Gold nyní nabízí kalibrátory ve variantách "low" a "high", a novější holandská studie prokazuje s novým kalibrátorem výsledky srovnatelné s OC-sensorem [32]. Ulrike Haug na zasedání výboru pro screening WEO CRC v Barceloně 2019 představila analýzu 2,8 milionu FIT provedených v Německu v roce 2018 pomocí technologií od 12 různých výrobců. Pro screening nebyl definován žádný cut-off, ale pro jednotlivé analyzátozy byl stanoven požadavek 25% citlivosti k detekci pokročilé neoplazie a > 90% specifická testu FIT [33]. Cut-off a pozitivita pro jednotlivé laboratorní i POCT analyzátozy byly pro OC-sensor (10 µg/g; 10,2 %), SENTIFIT-FOB Gold (17 µg/g; 7,9 %), CAREprime Hb (6 µg/g; 5,1 %), QuikRead Go (15 µg/g; 13,8 %), CerTest BIOTEC (8 µg/g; 21,1 %) a Eurolyser FOB (4 µg/g; 20,3 %).

Zcela shodné závěry lze vyvodit na základě výsledků kontroly EQA provedené u 175 účastníků pro analýzu FIT v České republice akreditovaným pracovištěm SEKK v dubnu 2020 [34]. Průměrná hodnota zkušebního vzorku Hb v µg/g, CV a počet účastníků pro nejčastěji používané analyzátozy jsou následující: OC-sensor (93 µg/g; 34; 7,2 %), SENTIFIT-FOB Gold (162 µg/g; 46; 10,0 %) a QuikRead Go (138 µg/g; 61; 24,0 %). Ve srovnání s analýzou OC-sensorem jsou hodnoty QuikRead Go 1,48krát vyšší, hodnoty FOB Gold 1,74krát vyšší, což zcela odpovídá německému doporučení pro OC-sensor 10 µg/g; FOB Gold 17 µg/g a QuikRead Go 15 µg/g.

## Externí kontrola kvality

Požadovaná preciznost a přesnost měření koncentrace hemoglobinu ve stolici je zcela provázána s kontrolou kvality. Evropské směrnice pro zajištění kvality při screeningu karcinomu tlustého střeva proto doporučují pouze testy kvantitativní, kde lze kontrolu kvality spolehlivě zajistit. [35 - 38]. Spolehlivost kvantitativní analýzy zajišťuje v České republice systém externí kontroly kvality podle standardů definovaných v ISO 15189 provozovaný společností SEKK, která je řádným členem European Committee for External Quality Assurance Programmes in Laboratory Medicine (EQALM), a rozvíjí spolupráci s významnými zahraničními poskytovateli EQA. Testovací vzorky od deseti poskytovatelů EQAS byly analyzovány na čtyřech kvantitativních analyzátozech pro FIT - HM-JACKarc/Kyowa, OC-sensor Pledia/

Eiken, SENTIFIT 270/Sentinel a NS-Prime/Alfresa [8]. Externí kontrola kvality může zahrnovat pre-analytickou i analytickou složku FIT. Pro EQAS prováděné v Anglii, Kanadě a Japonsku jsou uživatelům zasílány vzorky Hb v matrici odpovídající stolici buď jako vzorek stolice, nebo již výrobcem naplněné do odběrové zkumavky. EQAS v Německu, Itálii, Španělsku a SEKK v České republice zasílají vzorky Hb v tekuté, nebo lyofilizované formě. Variační koeficient (CV) byl vypočítán pro každý FIT analyzátor a hodnoty CV byly podstatně vyšší pro vzorky s matricí stolice (12,4-19,0 %) ve srovnání se vzorky Hb zasílané v tekuté formě (0,8-2,3 %).

Byly provedeny různé pokusy o vytvoření materiálů EQA vhodných pro hodnocení předanalytické fáze FIT. Lidská stolice se příliš liší texturou a obsahem vody a Hb je nestabilní proti teplu, proteinázám a peptidázám ve stolici a přežívajícím bakteriím. Řešení by mohlo být vytvoření umělé-arteficiální stolice jako matrix EQA pro FIT [39, 40]. Umělá stolice z centra HECTEF (Health Care Technology Foundation, Tokyo) je založena na rýžové mouce a obsahuje lidský hemoglobin A0 (HbA0) a glycerol jako vnitřní standard. Stabilita Hb s poklesem < 2 % byla prokázána při uchování v teplotě při -80 °C po dobu čtyř měsíců, -20 °C po dobu dvou týdnů a 5 °C po dobu dvou dnů [39].

## Post-analytická interpretace FIT

Inteligentní interpretace FIT testů [41] a personalizace screeningu kolorektálního karcinomu [42] není tématem tohoto přehledu. Koncentraci Hb ve stolici je nutno vyhodnocovat ve vztahu k věku, pohlaví a individuálnímu posouzení rizika vzniku KRCA na základě rodinné anamnézy, životního stylu, environmentálních a genetických faktorů. Perspektivou screeningu KRCA je personalizovaný, populační screening zahrnující inteligentní vyhodnocování FIT. Jediným aspektem, který lze řešit z pohledu laboratorní analytiky je variabilita FIT ve vztahu k věku a pohlaví. Tento aspekt je řešen pro mnoho analytů, kdy referenční meze jsou odlišné pro muže a ženy, nebo podle věku osob. Kritériem pro indikaci kolonoskopie je pozitivita FIT ve vztahu k definované cut-off koncentraci Hb.

V souboru 17 387 kolonoskopovaných osob byla pozitivita na FIT s cut-off 20 µg/g (OC-sensor Micro, Eiken) 8,3 % u mužů a 4,8 % u žen ( $p < 0,0001$ ). Detekce záhytu pokročilých neoplázií (ANDR - Advanced Neoplasia Deetection Rate) byla 44,0 % u mužů a 15,9 % u žen ( $p < 0,0001$ ) [43]. Při cut-off doporučené výrobcem (17 µg/g stolice - FOB Gold, Sentinel) byla citlivost pro detekci pokročilých neoplázií ve věku 65 - 79 let vyšší oproti věku 50 - 64 let (51,2 % oproti 34,7 %,  $p = 0,004$ ) a specifická byla nižší (91,0 % oproti 94,8 %,  $p < 0,001$ ) [44]. Studie provedená v Kaiser Permanente (USA) na souboru 640 859 osob [45] deklaruje doporučené cut-off při zvolené pozitivitě 8 % následovně: muži 20 µg/g, ženy 15 µg/g, ve vztahu k věku 50-59 let 15 µg/g, 60-69 let 20 µg/g, 70-75 let 25 µg/g.

## Příloha 1. Textový box - variabilita pokynů k odběru vzorku stolice

Zasuňte odběrový kartáček 3 – 6 krát do stolice na různých místech.
Při odběru vzorku otáčejte tyčinkou připojenou k víčku odběrové zkumavky na 3 různých místech stolice.
Pomocí odběrového hrotu odeberte část vzorku ze 3 jeho různých míst. Odstraňte přebytečný vzorek stolice papírovým ubrouskem.
Pomocí sběrné tyčky odeberte vzorek ze 3 různých míst. Záhyby tyčky musí být zakryté.
Odeberte vzorky stolice zanořením tyčinky do tří různých míst stolice. Odstraňte přebytečný vzorek stolice papírovým ubrouskem (toaletním papírem).
Pomocí odběrového hrotu odeberete vzorek stolice ze tří různých míst tak, aby zbyla stolice ve drážkách hrotu.
Opakovaným tahem kartáčku po povrchu stolice se nabere vzorek mezi jeho rýhy, tak aby byly zcela zaplněné.
Zasuňte špičku kartáčku do vzorku stolice (do hloubky asi 2 cm) a opakujte 3-5x tak, aby se drážky kartáčku zcela zaplnily.
Odběrovou tyčinkou zlehka píchnout do stolice-ze tří různých míst.
Dávkovací špičku ponořte drážkami do stolice a před vytažením s ní otočte. Postup opakujte na 3 až 5 různých místech vzorku stolice tak, aby se drážky dávkovací špičky zcela zaplnily.
Zanořte tyčinku do 5 – 6 míst stolice. Nestírejte tyčinkou povrch stolice. Zavřete pevně uzávěr a rázně zkumavku se vzorkem protřepejte.
Vzorek odeberete otočením tyčinky připojené k víčku zkumavky ze tří míst vzorku stolice.

## Literatura

1. **Young, G. P., Rabeneck, L., Winawer, S. J.** The Global Paradigm Shift in Screening for Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 2019, 156(4), s. 843-851.
2. **Kocna, P.** Stanovení hemoglobinu ve stolici - změny od ledna 2020, *Bulletin FONS*, 2019; č. 4, s. 25.
3. **Farrugia, A., Widlak, M., Evans, C. et al.** Faecal immunochemical testing (FIT) in symptomatic patients: what are we missing? *Frontline Gastroenterol.*, 2020, 11, s. 28-33.
4. **van Melle, M., Yep Manzano, S. I. S., Wilson, H., Hamilton, W., Walter, F. M., Bailey, S. E. R.** Faecal immunochemical test to triage patients with abdominal symptoms for suspected colorectal cancer in primary care: review of international use and guidelines. *Fam. Pract.*, 2020, 37(5), s. 606-615.
5. **Grobbee, E. J., Schreuders, E. H., Hansen, B. E. et al.** Association Between Concentrations of Hemoglobin Determined by Faecal Immunochemical Tests and Long-term Development of Advanced Colorectal Neoplasia. *Gastroenterology*, 2017, 153(5), s. 1251-1259.
6. **Senore, C., Zappa, M., Campari, C. et al.** Faecal haemoglobin concentration among subjects with negative FIT results is associated with the detection rate of neoplasia at subsequent rounds: a prospective study in the context of population based screening programmes in Italy. *Gut*, 2020, 69(3), s. 523-530.
7. **Fraser, C. G., Benton, S. C.** Detection capability of quantitative faecal immunochemical tests for haemoglobin (FIT) and reporting of low faecal haemoglobin concentrations. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2019, 57(5), s. 611-616.
8. **O'Driscoll, S., Piggott, C., Bruce, H., Benton, S. C.** An evaluation of ten external quality assurance scheme (EQAS) materials for the faecal immunochemical test (FIT) for haemoglobin. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2020, 59(2), s. 307-313.
9. **Rapi, S., Berardi, M., Cellai, F. et al.** Effects of fecal sampling on preanalytical and analytical phases in quantitative fecal immunochemical tests for hemoglobin. *Int. J Biol. Markers.*, 2017, 32(3), e261-e266.
10. **Padoan, A., D'Inca, R., Scapellato, M. L. et al.** Improving IBD diagnosis and monitoring by understanding preanalytical, analytical and biological faecal calprotectin variability. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2018, 56(11), s. 1926-1935.
11. **Benton, S. C., Symonds, E., Djedovic, N. et al.** Faecal Immunochemical Tests for Haemoglobin: Analytical Challenges and Potential Solutions. *Clin. Chim. Acta*, 2021 - submitted manuscript.
12. **Rapi, S., Rubeca, T., Fraser, C. G.** How to improve the performances of Faecal Immunological Tests (FIT): Need for standardization of the sampling and pre-analytical phases and revision of the procedures for comparison of methods. *Int. J Biol. Markers*, 2015, 30(1), e127-131.
13. **Fraser, C. G., Allison, J. E., Halloran, S. P. et al.** Expert Working Group on Faecal Immunochemical Tests for Hemoglobin, Colorectal Cancer Screening Committee WEO.: A proposal to standardize reporting units for faecal immunochemical tests for hemoglobin. *J Natl. Cancer Inst.*, 2012, 104, s. 810-814.
14. **Kocna, P., Zima, T.** Stanovisko ke stanovení hemoglobinu ve stolici kvantitativní analýzou. *Klin. Biochem. Metab.*, 2015, 23(2), s. 78-81.
15. **Kocna, P., Zima, T.** Doporučení České společnosti

- klinické biochemie ke správnému používání metody stanovení okultního krvácení ve stolici. *Tempus medicorum.*, 2015, 24(10), s. 30-31.
16. **Amitay, E. L., Gies, A., Weigl, K., Brenner, H.** Fecal Immunochemical Tests for Colorectal Cancer Screening: Is Fecal Sampling from Multiple Sites Necessary? *Cancers (Basel)*, 2019, 11(3), s. 400
  17. **Gies, A., Gruner, L. F., Schrotz-King, P., Brenner, H.** Effect of Imperfect Compliance With Instructions for Fecal Sample Collection on Diagnostic Performance of 9 Fecal Immunochemical Tests. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2019, 17(9), s. 1829-1839.
  18. **Piggott, C., John, C., Bruce, H., Benton, S. C.** Does the mass of sample loaded affect faecal haemoglobin concentration using the faecal immunochemical test? *Ann. Clin. Biochem.*, 2018, 55(6), s. 702-705.
  19. **Thom, C. S., Dickson, C. F., Gell, D. A., Weiss, M. J.** Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2013, 3(3), a011858.
  20. **Carroll, M. R., John, C., Mantio, D. et al.** An assessment of the effect of haemoglobin variants on detection by faecal immunochemical tests. *Ann. Clin. Biochem.*, 2018, 55(6), s. 706-709.
  21. **Takashima, Y., Shimada, T., Yokozawa, T.** Clinical benefit of measuring both haemoglobin and transferrin concentrations in faeces: demonstration during a large-scale colorectal cancer screening trial in Japan. *Diagnosis (Berl)*. 2015, 2(1), s. 53-59.
  22. **Grazzini, G., Ventura, L., Rubeca, T. et al.** Impact of a new sampling buffer on faecal haemoglobin stability in a colorectal cancer screening programme by the faecal immunochemical test. *Eur. J Cancer Prev.*, 2017, 26(4), s. 285-291.
  23. **Symonds, E. L., Cole, S. R., Bastin, D. et al.** Effect of sample storage temperature and buffer formulation on faecal immunochemical test haemoglobin measurements. *J Med. Screen.*, 2017, 24(4), s. 176-181.
  24. **Niedermaier, T., Weigl, K., Gies, A. et al.** Accuracy of a fecal immunochemical test according to outside temperature and travel time. *Clin. Epidemiol.*, 2018, 10, s. 1203-1213.
  25. **Catomeris, P., Baxter, N. N., Boss, S. C. et al.** Effect of Temperature and Time on Fecal Hemoglobin Stability in 5 Fecal Immunochemical Test Methods and One Guaiac Method. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2018, 142(1), s. 75-82.
  26. **Gies, A., Cuk, K., Schrotz-King, P., Brenner, H.** Direct comparison of ten quantitative fecal immunochemical tests for hemoglobin stability in colorectal cancer screening. *Clin. Transl. Gastroenterol.*, 2018, 9(7), e168.
  27. **Doubeni, C. A., Jensen, C. D., Fedewa, S. A. et al.** Fecal Immunochemical Test (FIT) for Colon Cancer Screening: Variable Performance with Ambient Temperature. *J Am. Board. Fam. Med.*, 2016, 29(6), s. 672-681.
  28. **Piggott, C., Carroll, M. R. R., John, C. et al.** Analytical evaluation of four faecal immunochemical tests for haemoglobin. *Clin Chem Lab Med.*, 2020, 59(1), s. 173-178.
  29. **Gies, A., Cuk, K., Schrotz-King, P., Brenner, H.** Direct Comparison of Diagnostic Performance of 9 Quantitative Fecal Immunochemical Tests for Colorectal Cancer Screening. *Gastroenterology*, 2018, 154(1), s. 93-104.
  30. **Toes-Zoutendijk, E., van Leerdam, M. E., Dekker, E. et al.** Real-Time Monitoring of Results During First Year of Dutch Colorectal Cancer Screening Program and Optimization by Altering Fecal Immunochemical Test Cut-Off Levels. *Gastroenterology*, 2017, 152(4), s. 767-775.
  31. **Lansdorp-Vogelaar, I.** Optimal FIT Screening for Men and Women in Case of Limited Colonoscopy Capacity: A Cost-Effectiveness Analysis. *WEO CRC Screening Committee, FIT for Screening, Barcelona, October 2019.*
  32. **de Klerk, C. M., Wieten, E., Lansdorp-Vogelaar, I. et al.** Performance of two faecal immunochemical tests for the detection of advanced neoplasia at different positivity thresholds: a cross-sectional study of the Dutch national colorectal cancer screening programme. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.*, 2019, 4(2), s. 111-118.
  33. **Haug, U.** Update on CRC screening in Germany. *WEO Colorectal Cancer Screening Committee, Barcelona, October 2019*
  34. Závěrečná zpráva k vyhodnocení cyklu EHK FOB1/20 - Okultní krvácení. [cit. 2021-02-03]. Dostupný na [www: <https://www.sekk.cz/eqa/2020/FOB120\\_Info.htm>](https://www.sekk.cz/eqa/2020/FOB120_Info.htm)
  35. **Halloran, S. P., Launoy, G., Zappa, M.** International Agency for Research on Cancer. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. First Edition-Faecal occult blood testing. *Endoscopy*, 2012, 44, Suppl 3, s. 65-87.
  36. **von Karsa, L., Patnick, J., Segnan, N. et al.** European Colorectal Cancer Screening Guidelines Working Group. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis: overview and introduction to the full supplement publication. *Endoscopy*, 2013, 45(1), s. 51-69.
  37. **Kocna, P.** Kvantitativní analýza hemoglobinu ve stolici - význam pro screening kolorektálního karcinomu. *Onkologická revue*, 2017, 6, s. 6-11.
  38. **Fraser, C. G.** Assuring the quality of examinations using faecal immunochemical tests for haemoglobin (FIT). *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2021, 59(2), s. 245-247.
  39. **Miike, A., Ogawa, Z., Sakurabayashi, I.** The development of an artificial stool usable for the surveillance of faecal haemoglobin testing. *Ann. Clin. Biochem.*, 2018, 55(3), s. 394-399.
  40. **Yasui, R., Yamada, M., Takehara, S. et al.** Novel artificial stool material for external quality assurance (EQA) on a fecal immunochemical test for hemoglobin (FIT): The confirmed utility of stable hemoglobin and an internal standard material. *Clin. Chim. Acta.*, 2018, 483, s. 76-81.

41. **Halloran, S. P.** Intelligent Use of the Fecal Immunochemical Test in Population-Based Screening. *Ann. Intern. Med.*, 2018, 169(7), s. 496-49.
42. **Kuipers, E. J., Spaander, M. C.** Personalized screening for colorectal cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2018, 15(7), s. 391-392.
43. **Arana-Arri, E., Idigoras, I., Uranga, B. et al.** Population-based colorectal cancer screening programmes using a faecal immunochemical test: should faecal haemoglobin cut-offs differ by age and sex? *BMC Cancer*, 2017, 17(1), s. 577.
44. **Brenner, H., Qian, J., Werner, S.** Variation of diagnostic performance of fecal immunochemical testing for hemoglobin by sex and age: results from a large screening cohort. *Clin. Epidemiol.*, 2018, 10, s. 381-389.
45. **Selby, K., Jensen, C. D., Lee, J. K. et al.** Influence of Varying Quantitative Fecal Immunochemical Test Positivity Thresholds on Colorectal Cancer Detection: A Community-Based Cohort Study. *Ann. Intern. Med.*, 2018, 169(7), s. 439-447.

Autor prohlašuje, že není ve střetu zájmů.

Do redakce došlo 9. 12. 2020

*Adresa pro korespondenci:*  
MUDr. Petr Kocna, CSc.  
Laboratoř gastroenterologie  
Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky,  
1. LF UK a VFN Praha  
Na Bojišti 3, 121 08 Praha 2  
email: kocna@lf1.cuni.cz