

# Stanovisko ke stanovení hemoglobinu ve stolici kvantitativní analýzou

Kocna P., Zima T.

Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN Praha, email: kocna@lf1.cuni.cz

## Úvod

Kolorektální karcinom (KRCA), představuje vážné zdravotní riziko pro evropskou populaci, převážně v regionu střední Evropy, kde je druhou nejčastější rakovinou stejně jako druhou nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu [1]. Evropské statistiky odhadují v roce 2012 počet 447 000 nově diagnostikovaných případů kolorektální rakoviny [2]. Screening KRCA se provádí buď v jednom, nebo ve dvou krocích. Jednostupňové programy zahrnují kolonoskopii, flexibilní sigmoidoskopii nebo CT kolonografii. Původní metoda dvoustupňových programů předpokládá testy okultního krvácení ve stolici (TOKS), které dříve byly na guajakové bázi (gFOBT) a v posledních letech se přechází na citlivější imunochemické FIT testy. V poslední době jsou testovány i další programy s kapslovou kolonoskopií nebo testování DNA [3]. Výskyt KRCA v České republice patří k nejvyšším v Evropě a v roce 2010 bylo diagnostikováno 8 265 pacientů s tímto karcinomem a 3 991 osob na toto onemocnění zemřelo, z toho 46,8% ve stadiu Dukes III-IV [4].

Členské státy unie by měly implementovat populační programy prevence zhoubných nádorů prsu, děložního hrdla, tlustého střeva a konečníku dle doporučení Rady Evropské unie [28] z 2. 11. 2003 (2003/878/EC). Pravidla screeningu KRCA v ČR popisuje Věstník MZ ČR [5]. KRCA je možné včas zachytit při správném použití screeningových metod již v časných stádiích onemocnění. V celopopulačním screeningu má význam nejen výtěžnost ověřená na principu vědeckých důkazů, ale také cena a způsob provedení, který musí být pro většinu populace dobře přijatelný.

Kolorektální karcinom (KRCA) vzniká malignizací adenomu sekvencí genetických mutací v průběhu průměrně deseti let a převaha nádorové tkáně je alespoň v počáteční fázi onemocnění lokalizována intraluminálně. Menší část kolorektálních karcinomů vzniká při přítomnosti rizikových faktorů, jako jsou nespecifické střevní záněty, familiární adenomová polypóza, hereditární nepolypózní kolorektální karcinom a další hereditární syndromy. Již v asymptomatické fázi onemocnění karcinom nebo adenomový polyp intermitentně krvácí.

Vyšetření na okultní krvácení ve stolici (TOKS) je v případě pozitivní indikací ke kolonoskopickému vyšetření a je proto prvním stupněm screeningu KRCA. Stanovení hemoglobinu ve stolici kvantitativní analýzou je v současné době optimální metodou, která splňuje kritéria pro screening definovaný WHO [6]. Senzitivita

kvalitativních imunochemických testů je nejméně dvojnásobná oproti guajakovým testům, ale jejich heterogenita a značné rozdíly v jejich efektivitě limitují jejich použití ve screeningových programech [7]. Kvantitativní analýza umožňuje, oproti kvalitativním - rapid testům, definovat optimální cut-off hodnotu, a právě toto optimální nastavení citlivosti a spolehlivosti testu je nyní cílem většiny evropských studií.

## Situace v České republice

Screening kolorektálního karcinomu (KRCA) má v České republice dlouhou tradici. V letech 1979–1984 byly provedeny pilotní studie s guajakovým testem na okultní krvácení ve stolici (gTOKS), na jejichž základě byl vytvořen národní program screeningu KRCA [8]. Národní program screeningu byl zahájen 1. 7. 2000 a Česká republika se stala v celosvětovém měřítku druhou zemí, v níž byl takový program přijat [9].

Screening KRCA se od ledna 2014 stává populačním screeningem a je organizován Radou pro screening kolorektálního karcinomu ČGS a Komisí pro screening nádorů kolorekta MZ ČR, ve spolupráci se zdravotními pojišťovnami [29]. Pro screening KRCA mohou TOKS testy indikovat pouze praktičtí lékaři a gynekologové a od roku 2009 jsou povoleny imunochemické testy (FIT) na okultní krvácení.

Imunochemické FIT testy zahrnují jak testy kvalitativní, rapid testy, tak i FIT testy třetí generace - kvantitativní. Kolonoskopicky ověřené studie, provedené ve VFN v Praze a publikované v letech 1992-2002 [10], kvalitativní FIT testy pro screening nikdy nedoporučily, a proto byl až do roku 2013 doporučován pro TOKS guajakový Haemoccult test.

Podle statistiky provedené v březnu 2014 používá 66% praktických lékařů právě tyto kvalitativní rapid testy [11]. Heterogenita kvalitativních FIT testů, jejichž parametry se bohužel značně liší, a mnohé používané testy mají naprostou absenci studií dokladujících jejich efektivitu, výrazně snižuje efektivitu screeningu KRCA v České republice a je na mezinárodních fórech právně kritizována.

Kvalitativní rapid testy jsou kritizovány především pro vysokou falešnou pozitivitu, která je na rozdíl od individuální diagnostiky v populačním screeningu větším rizikem než falešná negativita. Vede ke zvyšování nákladů, zbytečnému vyšetřování, komplikacím a negativnímu ovlivnění kvality života zdravých lidí. Kri-

tikou pro populační screening v České republice je pak navíc možnost používat libovolné FIT testy se značně rozdílnou senzitivitou.

Kvantitativní FIT testy byly doporučeny pro screening Radou screeningu KRCA ČGS v prosinci 2010. Vysoká specifická TOKS testů a srovnávání výsledků v jednotlivých národních programech je nezbytnou podmínkou masové depistáže. Tyto podmínky platily pro guajakový test a neplatí pro kvalitativní rapid testy [10]. Kvantitativní FIT testy splňují podmínky nutné pro populační screening a v porovnání s guajakovými testy nejméně trojnásobně zvyšují senzitivitu testu [12]. Přesná a správná hodnota koncentrace Hb ve stolici nabízí významnou možnost zahrnout hodnoty FIT testu do určení rizika algoritmu KRCA screeningu [13]. Kvantitativní FIT testy umožňují optimalizaci screeningu nastavením cut-off kriteria a spolehlivost testů je zajištěna systémem externí kontroly kvality.

Kvantitativní FIT je určen výhradně pro kvantitativní stanovení koncentrace hemoglobinu, není určen pro kvalitativní průkaz nebo semikvantitativní stanovení a je nabízen rovněž ve verzi pro POCT analyzátorů. Pilotní studie provedená v Praze [14] doporučuje pro screening v České republice provedení jednoho FIT testu při cut-off hodnotě 75 ng/ml (15 µg/g stolice). Spolehlivost kvantitativní analýzy zajišťuje systém externí kontroly kvality. SEKK v ČR od ledna 2012 zařadil do programu externího hodnocení kvality (EHK) nový program pro Okultní krvácení (FOB). Posledního cyklu v dubnu 2015 se účastnilo již 82 pracovišť, která kvantitativní FIT provádějí.

## Situace v evropských zemích

Optimalizace nastavení kvantitativní analýzy, pozitivita FIT testu indikující kolonoskopii (cut-off hodnota), porovnávání FIT metodik, počet prováděných FIT testů a způsob jejich distribuce jsou cíle evropských studií, kterých bylo v posledních šesti letech publikováno více než 180. Stručný přehled několika z nich demonstruje tento evropský rozsah z vybraných deseti zemí, které optimalizaci screeningu KRCA řeší.

Španělská multicentrická, prospektivní studie na souboru 5 595 osob [15] prokázala, že provedení dvou testů nezvyší diagnostickou přesnost, ale zvýší cenu, počet nutných kolonoskopií a také počet nalezených lézí. Optimální nalezená cut-off je 115 ng/ml.

Skotská studie s rozesláním jedné kazety OC-Sensor 66 225 osobám ve věku 50 - 74 [16] prokázala vysokou návratnost testu – 60,6% a skutečnost, že koncentrace f-Hb je ve vztahu k závažnosti a stádiu KRCA a současně je ve vztahu k velikosti lézí. Irská studie s poštovním rozesláním dvou testů OC-Sensor 9 704 osobám ve věku 50 - 74 let [17] měla návratnost 52% a prokázala, že při provedení jen jednoho testu je procento nezachycených karcinomů 17,6% a neoplazií včetně pokročilých adenomů 30%.

Německá studie [18] porovnávala spolehlivost ELISA FIT testů s detekcí Hb nebo Hb/Hpt a automatizované analýzy s OC-Sensorem, u které prokázali nej-

vyšší záchyt neoplazií, 73,3% pro KRCA a 25,7% pro pokročilé adenomy. Slovinská studie [19] na souboru 9 189 osob ve věku 65 – 69 let, kterým byly poštou zaslány dvě odběrové kazety pro MagStream HT, měla návratnost kitů 90,8%, pozitivitu 7,4%, ADR (Adenoma Detection Rate) 53,8% a 73,3% nalezených KRCA bylo ve stádiu Dukses I or II. Francouzská studie [20] analyzovala soubor 19 797 osob ve věku 50-74 let, které provedly tři testy ve třech stolicích - guajakový test, MagStream a OC Sensor, který prokázal nejvyšší spolehlivost a nejvyšší záchyt osob s KRCA.

Belgická studie [21] porovnávala na souboru 19 542 rezidentů Flanders, ve věku 50-74 let, dvě strategie screeningu. Prokázala, že zaslání kazety OC-Sensor poštou má signifikantně vyšší návratnost 52,3% s detekcí neoplazií a KRCA 2,86%, než strategie zvaní osob k praktickým lékařům. Italská studie [22] analyzovala význam opakovaného FIT testu na souboru 9 800 obyvatel, kterým byl FIT test nabízen ve čtyřech cyklech, v letech 2001, 2003, 2006 a 2008.

Holandská studie [23] zdůrazňuje, že přidání kriterií rizika k hodnotě FIT testu zvyšuje jeho přesnost a spolehlivost a může být použito k preselekcii indikace kolonoskopie při screeningu. Personalizovaný přístup k diagnostickým testům, včetně screeningu je perspektivou, kterou je nutno akceptovat. Variabilita FIT hodnot ve vztahu k věku a pohlaví byla publikována v Británii [24].

Dosavadní studie naznačují, že okultní krvácení testované pomocí FIT zůstane nejlepším testem pro populační screening KRCA v příštím desetiletí. Kvantitativní FIT nabízí významnou možnost zahrnující hodnoty FIT testu do rizika algoritmu KRCA screeningu [13]. Nastavení cut-off hodnoty pro kvantitativní analýzu Hb ve stolici se řídí epidemiologickými, ekonomickými i zdravotnickými hledisky, např. dostupností screeningové kolonoskopie v jednotlivých zemích.

## Kvantitativní imunochemická detekce hemoglobinu ve stolici

Zásadní změnou pro aplikaci FIT testů při screeningu KRCA byly před 10 lety studie s kvantitativní analýzou hemoglobinu ve stolici na imunochemických automatických analyzátoch, především studie Leviho a Rosena [25], která byla rozhodující také pro naše pracoviště [26].

Kvantitativní stanovení lidského hemoglobinu ve stolici je založeno na aglutinační latexové reakci s protilátkou k A0 lidskému hemoglobinu. Metoda stanovuje hemoglobin s polyklonální protilátkou k Hb A0 IgG - resp. s mnohanásobnou monoklonální protilátkou. Vlastní analýza je prováděna turbidimetrickým měřením, kalibrace je většinou několikabodová v rozsahu měření definované výrobcem analyzátoru.

Výhody kvantitativního stanovení Hb ve stolici jsou následující:

- založen je na detekci lidského hemoglobinu, a proto nevyžaduje žádnou dietu;
- koncentrace Hb ve stolici je ve vztahu k velikosti lézí a závažnosti/stádiu KRCA [16];

- kvantitativní analýza umožňuje definovat optimální cut-off hodnotu;
- analýzu lze realizovat analyzátory v laboratorních nebo POCT metodou v ambulancích lékaře.

## Doporučená jednotka pro kvantitativní imunochemický test – µg Hb/g stolice

Kvantitativní hodnoty FIT testu se dosud vyjadřovaly analytickým aspektem, koncentrací Hb v detekčním pufru, v ng/ml. S ohledem na nutnost porovnávat kritéria positivity (cut-off) ve studiích provedených metodou FIT různých výrobců je zcela nezbytné přepočítávat hodnoty na koncentraci µg Hb/g stolice, které umožní srovnávat FIT testy provedené s rozdílnou odběrovou kazetou. Tento přepočet je zcela nezbytný pro epidemiologické hodnocení populačního screeningu KRCA v České republice, kde jsou nyní používány FIT testy různých výrobců, lišící se odběrovou kazetou, množstvím odebrané stolice a rozdílným objemem stabilizačního pufru. Tento aspekt již několik let zdůrazňuje prof. Halloran - Director NHS Bowel Cancer Screening Programme [27].

Doporučenou jednotkou je proto klinicky významná koncentrace Hb v µg/g stolice, která je od ledna 2015 vyžadována v systému externí kontroly kvality (SEEK).

Korekční faktor pro přepočet analytické koncentrace (ng/ml) na klinicky významnou koncentraci (µg/g stolice) je závislý na typu odběrové nádoby a lze je spočítat ze dvou údajů - množství stolice v mg a objem extrakčního pufru v ml.

Příklady pro některé odběrové nádoby - Eiken OC-Sensor (10 mg/2 ml; faktor 0,2), Orion QuickRead (10 mg/2 ml; faktor 0,2), Sentinel FOB (10 mg/1,7 ml; faktor 0,17), Linear Clonatest (20 mg/1,6 ml; faktor 0,08).

## Shrnutí

Stanovení hemoglobinu ve stolici kvantitativní imunochemickou technologií (FIT) je v současné době nejpřesnější metodou stanovení okultního krvácení, vhodnou pro celopopulační screening KRCA.

Kvantitativní analýza byla doporučena Radou screeningu KRCA ČGS již v roce 2010, avšak populační screening KRCA od roku 2014 umožňuje použití nejrozličnějších FIT testů, kvalitativních i kvantitativních. Rizikem kvalitativních FIT testů je vysoká falešná pozitivita, zvyšující nároky na screeningové kolonoskopie. Rizikem heterogenity povolených FIT testů je výrazné zkrácení efektivity screeningu pro jednotlivé oblasti České republiky.

ČSKB doporučuje z hlediska kvality a vyhodnocování péče o pacienty a epidemiologické srovnatelnosti výsledků, prováděných v České republice jednotný postup vyjadřovaný koncentrací Hb ve stolici, v jednotkách µg/g stolice.

Spolehlivost kvantitativní analýzy prováděné v laboratorních i pomocí POCT analyzátorů má být pravidelně ověřována externí kontrolou kvality, v souladu s doporučením Evropské unie.

## Literatura

1. **Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W., Comber, H., Forman, D., Bray, F.** Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur. J. Cancer.*, 2013, 49, p. 1374-1403
2. **Steliarova-Foucher, E., O'Callaghan, M., Ferlay, J., Masuyer, E., Forman, D., Comber, H., Bray, F.** European Cancer Observatory: Cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Survival in Europe. Version 1.0 (September 2012) European Network of Cancer Registries, International Agency for Research on Cancer.
3. **Carroll, M. R., Seaman, H. E., Halloran, S. P.** Tests and investigations for colorectal cancer screening. *Clin. Biochem.*, 2014, 47(10-11), p. 921-939
4. **Zavoral, M., Suchanek, S., Majek, O., Fric, P., Minarikova, P., Minarik, M., Seifert, B., Dusek, L.** Colorectal cancer screening: 20 years of development and recent progress. *World J. Gastroenterol.*, 2014, 20(14), p. 3825-3834
5. Věstník MZ ČR č. 01/2009 (str. 20-23): Standard při poskytování a vykazování výkonů screeningu nádorů kolorekta v České republice
6. **Holland, W. W., Stewart, S., Masseria, C.** Screening in Europe-Policy Brief. European Observatory on Health Systems and Policies, *WHO European Centre for Health Policy* 2006; p.1-72
7. **Hundt, S., Haug, U., Brenner, H.** Comparative evaluation of immunochemical fecal occult blood tests for colorectal adenoma detection. *Ann. Intern. Med.*, 2009, 150, p. 162-169
8. **Frič, P.** The use of Haemoccult test in the early diagnosis of colorectal cancer – experience from six pilot studies in Czechoslovakia. In: *Hardcastle JV: Haemoccult screening for the early detection of colorectal cancer.* Schattauer, Stuttgart, 1986, p. 73-74.
9. **Ladmanová, P., Zavoral, M.** Kolorektální karcinom - screening, diagnostika, léčba. Závazná doporučení efektivní léčebně preventivní péče, *Česká a slovenská gastroenterologie*, 1999, 53, p. 61-63
10. **Dvořák, M., Kocna, P., Vaničková, Z.** Okultní krvácení ve stolici - srovnání imunochemického a biochemického testu stanovení. *Časopis lékařů českých* 2002, 141(7), p. 217-219
11. **Seifert, B.** Screening kolorektálního karcinomu v roce 2014, *Practicus* 2014, 5, p. 29-30
12. **Kocna, P., Vaničková, Z., Zima, T.** Laboratory screening markers in gastroenterology - state of the art. *Biomed. Pap.*, 2013, 157(2), p. 91-97
13. **Benton, S. C., Seaman, H. E., Halloran, S. P.** Faecal Occult Blood Testing for Colorectal Cancer Screening: the Past or the Future. *Curr. Gastroenterol. Rep.*, 2015, 17(7), doi 10.1007/s11894-015-0428-2
14. **Kovářová, J. T., Zavoral, M., Zima, T., Žák, A., Kocna, P., Kohout, P., Granátová, J., Vaničková, Z., Vránová, J., Suchánek, S., Beneš, Z., Celko, M. A., Povýšil, C.** Improvements in colorectal cancer screening programmes - quantitative immunochemical faecal occult blood testing - how to set the cut-off for a particular population. *Biomed. Pap.*, 2012, 156(2), p. 143 - 150
15. **Castro, I., Cubiella, J., Rivera, C., González-Mao, C., Vega, P., Soto, S., Hernandez, V., Iglesias, F., Alves, M. T., Bujanda, L., Fernández-Seara, J.** Fecal immunochemical test accuracy in familial risk colorectal cancer screening. *Int. J. Cancer.*, 2014, 134(2), p. 367-75.

16. **Digby, J., Fraser, C. G., Carey, F. A., McDonald, P. J., Strachan, J. A., Diamant, R. H., Balsitis, M., Steele, R. J.** Faecal haemoglobin concentration is related to severity of colorectal neoplasia. *J. Clin. Pathol.*, 2013, 66(5), p. 415-419
17. **Kelley, L., Swan, N., Hughes, D. J.** An analysis of the duplicate testing strategy of an Irish immunochemical FOBT colorectal cancer screening programme. *Colorectal Disease*, 2013, 15(9), e512–e521
18. **Brenner, H., Tao, S.** Superior diagnostic performance of faecal immunochemical tests for haemoglobin in a head-to-head comparison with guaiac based faecal occult blood test among 2235 participants of screening colonoscopy. *Eur. J. Cancer.*, 2013, 49(14), p. 3049-3054
19. **Tepeš, B., Stabuc, B., Stefanovič, M., Bračko, M., Frkovič Grazio, S., Novak Mlakar, D., Maučec Zakotnik, J.** Faecal immunochemical test-based colorectal cancer screening programme SVIT in Slovenia: pilot phase. *Eur. J. Cancer. Prev.*, 2014, 23(4), p. 235-239
20. **Raginel, T., Puvinel, J., Ferrand, O., Bouvier, V., Levillain, R., Ruiz, A., Lantieri, O., Launoy, G., Guittet, L.** A population-based comparison of immunochemical fecal occult blood tests for colorectal cancer screening. *Gastroenterology*, 2013, 144(5), p. 918-925
21. **van Roosbroeck, S., Hoeck, S., Van Hal, G.** Population-based screening for colorectal cancer using an immunochemical faecal occult blood test: a comparison of two invitation strategies. *Cancer. Epidemiol.*, 2012, 36(5), e317-324
22. **Crotta, S., Segnan, N., Paganin, S., Dagnes, B., Rosset, R., Senore, C.** High rate of advanced adenoma detection in 4 rounds of colorectal cancer screening with the fecal immunochemical test. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2012, 10(6), p. 633-638
23. **Stegeman, I., de Wijkerslooth, T. R., Stoop, E. M. et al.** Combining risk factors with faecal immunochemical test outcome for selecting CRC screenees for colonoscopy. *Gut*. 2014, 63(3), p. 466 - 471
24. **Fraser, C. G., Rubeca, T., Rapi, S., Chen, L. S., Chen, H. H.** Faecal haemoglobin concentrations vary with sex and age, but data are not transferable across geography for colorectal cancer screening. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2014, 52(8), p. 1211-1216
25. **Levi, Z., Rozen, P., Hazazi, R. et al.** A Quantitative immunochemical fial occult blood test for colorectal neoplasia. *Ann. Intern. Med.*, 2007, 146(4), p. 244–255.
26. **Kocna, P., Vaníčková, Z., Kovářová, J., Krechler, T., Kohout, P., Beneš, Z., Granátová, J.** Evaluation of Quantitative Detection of Fecal Human Haemoglobin for Colorectal Cancer Screening. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2009, 47-Suppl. 160
27. **Fraser, C. G., Allison, J. E., Halloran, S. P., Young, G. P.** Expert Working Group on Fecal Immunochemical Tests for Hemoglobin, Colorectal Cancer Screening Committee, World Endoscopy Organization. A proposal to standardize reporting units for fecal immunochemical tests for hemoglobin. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 2012, 104(11), p. 810-814
28. EU Council Recommendation of 2 December 2003 on cancer screening. Official Journal of the European Union 2003/878/EC
29. **Suchanek, S., Majek, O., Vojtechova, G., Minarikova, P., Rotnaglova, B., Seifert, B., Minarik, M., Kozeny, P., Dusek, L., Zavoral, M.** Colorectal cancer prevention in the Czech Republic: time trends in performance indicators and current situation after 10 years of screening. *European Journal of Cancer Prevention*, 2014, 23, p. 18-26