

Kvantitativní analýza hemoglobinu ve stolici – význam pro screening kolorektálního karcinomu

Quantitative analysis of haemoglobin in stool – importance for colorectal cancer screening

MUDr. Petr Kocna, CSc.

Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. LF UK a VFN Praha



SOUHRN

Screening kolorektálního karcinomu má v České republice dlouhou tradici. Vysoká specifická screeningových testů je nezbytnou podmínkou pro použití v masové depistáži. Na rozdíl od individuální diagnostiky je v populačním screeningu větším rizikem falešná pozitivita než negativita, protože vede ke zvyšování nákladů, zbytečnému vyšetřování, komplikacím a negativnímu ovlivnění kvality života zdravých lidí. Kvantitativní stanovení hemoglobinu ve stolici je v současné době nejpřesnější metodou stanovení okultního krvácení vhodnou pro screening kolorektálního karcinomu. Optimalizace screeningu je řešena ve všech zemích, kde fekální imunochemický test (faecal immunochemical test, FIT) nahradil guajakové testy, a týká se cut-off kritéria positivity, počtu provedených testů, kombinace FIT s dalšími biomarkery a způsobu distribuce i analýzy vzorků. Standardizace a harmonizace FIT je nezbytnou podmínkou populačního screeningu kolorektálního karcinomu, přesnost a spolehlivost kvantitativní detekce hemoglobinu ve stolici musí být zajištěna externí kontrolou kvality.

KLÍČOVÁ SLOVA

kolorektální karcinom, screening, okultní krvácení, kvantitativní imunochemická detekce

SUMMARY

Colorectal cancer screening has a long tradition in the Czech Republic. High specificity of screening tests is a prerequisite for use in mass screening. Unlike individual diagnostics, there is a higher risk of false positivity than negativity in population screening because it leads to increased costs, unnecessary investigation, complications, and a negative impact on the quality of life of healthy people. Quantitative haemoglobin detection in stool is currently the most accurate method of determining occult bleeding suitable for colorectal cancer screening. Optimization of screening is addressed in all countries where faecal immunochemical test (FIT) has replaced guaiac tests and involves cut-off criteria for positivity, number of tests performed, combination of FIT with other biomarkers, and distribution and sample analysis. Standardization and harmonization of FIT is a prerequisite for population screening of colorectal cancer and the accuracy and reliability of quantitative detection of haemoglobin in the stool should be ensured by external quality control.

KEY WORDS

colorectal cancer, screening, occult bleeding, quantitative immunochemical detection

ÚVOD

Kolorektální karcinom (KRK) představuje vážné zdravotní riziko pro evropskou populaci, kde je druhým nejčastějším zhoubným nádorem, stejně jako druhou nejčastější příčinou úmrtí na nádorová onemocnění.¹ Evropské statistiky odhadovaly v roce 2012 celkem asi 447 000 nově diagnostikovaných KRK. V České republice bylo v roce 2012 diagnostikováno 8 336 pacientů s KRK a 3 628 osob na toto onemocnění zemřelo, z toho 42 % ve stadiu Dukes III–IV.²

Kolorektální karcinom je onemocněním s genetickým podkladem. V průběhu malignizace dochází k přeměně normální sliznice přes adenom na karcinom. Proces kancerogeneze trvá v průměru 8–10 let, a proto je možné screeningem zachytit premalignní stadia, adenomy, a jejich odstraněním zabránit vzniku karcinomu. Screening kolorektálního karcinomu je spolu se screeningem karcinomu prsu a děložního hrdla součástí národních programů onkologického screeningu v souladu s doporučením Rady Evropské unie z 2. 11. 2003³ o implementaci populačních programů prevence zhoubných nádorů prsu, děložního hrdla a tlustého střeva.

SCREENING KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

Screening kolorektálního karcinomu má v České republice dlouhou tradici. V letech 1979–1984 byly provedeny pilotní studie s guajakovým testem⁴ na okultní krvácení ve stolici. Národní program screeningu byl zahájen 1. 7. 2000, a Česká republika se tak stala v celosvětovém měřítku druhou zemí, v níž byl takový program přijat. V lednu 2014 byl screening modifikován a populační screening je od tohoto data organizován Radou pro screening kolorektálního karcinomu České gastroenterologické společnosti ČLS JEP a Komisí pro screening nádorů kolorekta MZ ČR ve spolupráci se zdravotními pojišťovnami.

Screeningové programy kolorektálního karcinomu v Evropě používají nejčastěji imunochemickou detekci okultního krvácení (faecal immunochemical test, FIT). Tento test využívá v současné době již 18 evropských států, guajakový test se stále ještě používá v 11 státech, kolonoskopie v 7 státech a sigmoidoskopie ve 2 státech.⁵ Screening KRK ve Spojených státech amerických zahrnuje mnohem širší

nabídku testů, a to včetně DNA analýzy stolice, irigografie a CT virtuální kolografie.⁶ Národní program screeningu KRK v České republice nabízí pro asymptomatické osoby ve věku 50–54 let každoroční test okultního krvácení ve stolici metodou FIT a od 55 let dvě varianty – screeningovou kolonoskopii nebo FIT ve dvouletém intervalu. Při pozitivním FIT screening samozřejmě pokračuje screeningovou kolonoskopií.

VYŠETŘENÍ NA OKULTNÍ KRVÁCENÍ VE STOLICI

Test okultního krvácení ve stolici (TOKS) je v případě pozitivity indikací ke kolonoskopickému vyšetření, a je proto prvním stupněm screeningu KRK.

Detekce krvácení testy s guajakovou pryskyřicí

Detekce okultního krvácení testy s guajakovou pryskyřicí (guaiac fecal occult blood test, gFOBT) vyžadovala dietní omezení. I při dodržení diety však mohl být výsledek falešně negativní nebo falešně pozitivní, což záviselo na přítomnosti oxidačně-redukčních látek ve stolici. Guajakový test má relativně velmi nízkou senzitivitu, ale vykazuje téměř 100% specifitu. Finská studie provedená na souboru 360 000 osob ve věku 60–69 let však prokázala minimální efekt screeningu gFOBT.⁷ Pozitivita gFOBT byla pouze 3,6 % a 386 screeningem zachycených karcinomů reprezentovalo jen 42,7 % všech zachycených případů, zatímco zbývajících 517 (57,3 %) karcinomů bylo diagnostikováno bez screeningu.

Imunochemické testy detekce krve ve stolici

Imunochemické testy k detekci okultního krvácení – FIT jsou založeny na imunochemické reakci hemoglobinu s monoklonální protilátkou proti lidskému globinu. Tato specifická detekce vylučuje možnost ovlivnění jiným zdrojem hemoglobinu (strava), odpadá interference chemických látek a není nutná speciální dieta. Citlivost imunochemických testů je několikanásobně vyšší než gFOBT a závisí na použité technologii.⁸

Kvalitativní imunochemické testy (rapid-testy) jsme již v osmdesátých letech minulého století porovnávali ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze v kolonoskopicky ověřených studiích s gFOBT. Prokázali jsme sice dvojnásobnou citlivost FIT (56,8 %) oproti gFOBT, ale specifita FIT výrazně klesala s falešnou

pozitivitou.⁹ Žádný z testovaných imunochemických rapid-testů proto nebyl doporučen pro screening KRK. I přes tuto skutečnost však byly v roce 2014 kvalitativní imunochemické rapid-testy, alespoň podle dotazníku, který zpracovalo 522 praktických lékařů v roce 2014, prováděny v 66 % ordinací, a to dokonce 13 rozdílnými metodami.¹⁰

Na rizika aplikace testů POCT (point of care testing) pro screening kolorektálního karcinomu, především kvalitativních rapid-testů, upozorňuje nejnovější německá studie¹¹, která zdůrazňuje, že evropské směrnice pro zajištění kvality při screeningu karcinomu tlustého střeva doporučují pouze testy kvantitativní, zatímco kvalitativní FIT nejsou pro screeningový program se zaručenou kvalitou obhajitelné.

Stanovení hemoglobinu ve stolici kvantitativní analýzou je v současné době optimální metodou, která splňuje kritéria pro screening definovaná Světovou zdravotnickou organizací (World Health Organization, WHO).¹² Kvantitativní analýza hemoglobinu ve stolici vykazuje pro detekci kolorektálního karcinomu téměř 90% senzitivitu (gFOBT jen 26–35%) a koncentrace hemoglobinu ve stolici je ve vztahu k velikosti lézí a závažnosti/stadiu KRK.¹³ Analýza je automatizovatelná, není ovlivněna subjektivním posuzováním testu, a především umožňuje optimalizaci spočívající v definování kritéria positivity (cut-off hodnoty), indikující následnou screeningovou kolonoskopii. Kvantitativní FIT lze provádět pomocí analyzátorů v laboratořích nebo metodami POCT v ambulancích lékařů. Ve většině zemí proto již nyní nahrazuje guajakové testy.

KVANTITATIVNÍ FIT A OPTIMALIZACE SCREENINGU KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

Dosavadní studie naznačují, že okultní krvácení testované pomocí FIT zůstane nejlepším testem pro populační screening kolorektálního karcinomu v příštím desetiletí, mimo jiné i proto, že kvantitativní FIT nabízí významnou možnost zahrnout hodnoty FIT testu do rizika v algoritmu screeningu KRK.¹⁴

Optimalizace screeningu KRK se řídí epidemiologickými, ekonomickými i zdravotnickými hledisky, např. dostupností screeningové kolonoskopie v jednotlivých zemích, a zahrnuje nastavení kritéria positivity, předpokládané počty a frekvenci FIT testů, způsob distribuce a analýzy

testů, kombinaci FIT analýzy s dalšími biomarkery a v poslední době také personalizaci screeningových programů.

Optimalizace analýzy FIT hodnotou cut-off a počtem testů

Většina studií je zaměřena na optimalizaci hodnoty cut-off FIT testu nebo na provedení více testů místo jednoho vzhledem k tomu, že adenomy krvácejí intermitentně. Ostatně i dříve používaný guajakový test se prováděl standardně ve třech po sobě jdoucích stolicích.

Irská studie¹⁵ s poštovním rozesláním dvou testů OC-Sensor 9704 osobám ve věku 50–74 let měla návratnost 52 % a prokázala, že při provedení jen jednoho testu s cut-off 100 ng/ml je procento nezachycených karcinomů 23,5 % a pokročilých adenomů 32 %. Při snížení cut-off na 75 ng/ml klesla falešná negativita pro karcinomy na 17,6 %. Kapidzic¹⁶ neprokázal zvýšení detekce pokročilých adenomů při použití dvou testů místo jednoho shodně jako Hernandez¹⁷, který zdůrazňuje, že provedení dvou testů nezvyšuje diagnostickou efektivitu, ale zvyšuje cenu a počet provedených kolonoskopií ve vztahu k nalezeným neoplaziím. Zvýšení ceny screeningu a počet nutných kolonoskopií popisuje rovněž Castro¹⁸ v multicentrické prospektivní studii na souboru 5595 osob a doporučuje optimální cut-off kritérium 115 ng/ml. Cha¹⁹ popisuje při snížení cut-off hodnoty z 20 µg/g na 10 µg/g zvýšení detekce pokročilých neoplazií o 60 %. Naše studie Kovářové²⁰ prokázala při jednom testu s cut-off 100 ng/ml falešnou negativitu 28,6 % a její snížení na 25,4 % s použitím dvou testů s cut-off 75 ng/ml.

Problematiku potřebných kolonoskopií řeší holandská studie²¹, která ukázala, že zvýšením věku testovaných osob z 50 na 55 let nebo zvýšením cut-off z 10 µg/g na 15 µg/g by počet endoskopií klesl o 14 % nebo 11 %, zatímco počet nalezených adenomů by klesl pouze o 9 % nebo o 6 %.

Optimalizace screeningu analýzou dalšího biomarkeru

Dánská studie²² navrhla pro snížení falešné pozitivitu a redukci zbytečných kolonoskopií zavést třístupňový screening místo zvyšování cut-off kritéria FIT. Počet pacientů s neoplastickými lézemi, které nebyly zachyceny při zvýšené hodnotě cut-off, byl mnohem vyšší, než se

očekávalo, a studie proto navrhuje do screeningu zahrnout i nukleosomální krevní testy. Navržený postup screeningu by mohl snížit frekvenci zbytečných kolonoskopií až o 25 %.

Brenner²³ porovnával citlivost FIT v provedení FOB Gold test se studií MSDT, analyzující DNA ve stolici metodou Cologuard. Pokud specifitu FIT testu nastavili na 86,9 %, odpovídající studii MSDT, byla senzitivita FIT při cut-off 8,4 µg/g pro karcinomy 96,7 % (Cologuard 92,3 %), pro pokročilé adenomy 47,4 % (Cologuard 42,4 %) a pro adenomy s nízkým rizikem 19,5 % (Cologuard 17,2 %). Senzitivita FIT tedy byla signifikantně vyšší než senzitivita analýzy DNA pro všechny testované patologie, a to při výrazně nižších nákladech. Ke zvýšení specifity doporučil již dříve Calistri²⁴ postup spočívající v následném provedení fekálního DNA testu u FIT-pozitivních jedinců. Autoři ukázali, že tento postup zvyšuje u FIT-pozitivních osob predikci neoplastických změn.

Hemoglobin-haptoglobinový komplex v dvojkombinaci s proteinem S100A12, resp. v trojkombinaci se tkáňovým inhibitorem metaloproteinázy 1 (TIMP-1), porovnával Karl.²⁵ Senzitivita 98 % pro kolorektální karcinom při specifitě 82 % byla výrazně vyšší než při samostatném testu FIT. V jiné studii²⁶ vedlo kombinované použití FIT s fekálním kalprotektinem a proteinkinázou M2PK k dosažení citlivosti 95 % a specifity 47,5 % pro detekci adenomů nad 1 cm.

Personalizace screeningových programů

Problematikou personalizovaného screeningu se zabývala celá řada studií, a to jak ve vztahu k věku a pohlaví testovaných osob^{27,28}, tak ve vztahu k diabetu nebo metabolickému syndromu²⁹.

Studie Kallenberga³⁰ srovnávala detekci pokročilých neoplazií při cut-off 10 a 20 µg/g při současném zvažování anamnestického rodinného rizika. Při cut-off 10 µg/g stoupla senzitivita detekce pokročilých neoplazií z 36 % na 52 %, ovšem specifita testu klesla z 93 % na 79 %, což výrazně zvýšilo falešnou pozitivitu.

Studie Westwooda³¹ analyzovala efektivitu automatizovaných testů FIT OC-Sensor (Eiken, Japonsko), HM-JACKarc (Kyowa Medex, Japonsko), FOB Gold (Sentinel, Itálie) a komplex

Ridascreen Hb/Ht (R-Biopharm, Německo) pro symptomatické osoby s nízkorizikovými příznaky kolorektálního karcinomu. Testy FIT pro nemocné s příznaky v dolní části zažívacího ústrojí ve vztahu ke kritériím pro screening KRK a doporučení NICE guideline NG12, zveřejněné National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) v roce 2015, hodnotí také Quyn.³²

Digby³³ analyzoval počty zachycených karcinomů oproti intervalovým karcinomům ve vztahu ke cut-off testu FIT a počtu nutných kolonoskopií. V souboru 30 893 osob byla kolonoskopie provedena 753krát, což při cut-off 80 µg/g odpovídalo 2,4% pozitivitě testu (srovnatelné s gFOBT). Podíl intervalových karcinomů činil 50,8 %. Snížením cut-off na 10 µg/g stoupla pozitivita z 2,4 % na 9,4 % a počet potřebných kolonoskopií se zvýšil ze 753 na 2 147, procento intervalových karcinomů kleslo na 38,3 %.

Takashima³⁴ popsál zvýšení pozitivitu screeningového testu ze 6,7 % pro FIT na 10,1 % pro FIT + transferrin. Pozitivita transferrinu, je-li stanovena samostatně, je výrazně vyšší ($p < 0,0001$) u žen (4,9 %) oproti mužům (2,7 %), což lze vysvětlit signifikantně vyšší frekvencí zácpy v transferrin-pozitivní skupině.

KVANTITATIVNÍ FIT – SPOLEHLIVOST A PŘESNOST ANALÝZY, STANDARDIZACE A HARMONIZACE

Kvantitativní analýza stanovení koncentrace hemoglobinu ve stolici vyžaduje zajištění přesného a správného měření nejen pro správné nastavení cut-off kritéria pozitivitu FIT indikující následnou kolonoskopii, ale také pro personalizaci screeningových programů.

Grobbee³⁵ zdůrazňuje význam každé konkrétní hodnoty provedeného FIT, a to včetně tzv. negativních FIT testů s hodnotou nižší než cut-off. Po osmi letech sledování měli účastníci s výchozími koncentracemi hemoglobinu 8–10 µg/g vyšší kumulativní výskyt pokročilých neoplazií (33 %) než účastníci s nulovou hodnotou hemoglobinu (5 %, $p < 0,001$). Účastníci se dvěma po sobě následujícími koncentracemi 8 µg/g měli 14násobně zvýšené riziko pokročilé neoplazie ve srovnání s účastníky se dvěma po sobě jdoucími nulovými koncentracemi hemoglobinu ve stolici ($p < 0,001$). Výchozí a následné koncentrace hemoglobinu ve stolici byly vyhodnoceny jako nezávislé prediktory

pro rozvoj pokročilých neoplazií. Tyto informace by měly být použity při navrhování personalizovaných strategií pro screening KRK.

V současné době je velmi obtížná přenositelnost (transferabilita) výsledků kvantitativní analýzy hemoglobinu ve stolici provedené na analyzátoch používajících odlišné (výrobce definované) protilátky, což z epidemiologických aspektů znemožňuje porovnávání národních screeningových programů. Expertní pracovní skupina FIT for Screening při World Endoscopy Organization (WEO) navrhuje vytvoření nezávislého kalibračního procesu s mezinárodně uznávaným standardem hemoglobinu.³⁶ Standardizaci stanovení hemoglobinu ve stolici se věnuje od června 2017 také expertní pracovní skupina Fecal Immunochemical Testing při International Federation of Clinical Chemistry (IFCC).

Kvantitativní hodnoty testu FIT se dosud vyjadřovaly analytickým aspektem, koncentrací hemoglobinu v detekčním pufru v ng/ml. Současný nedostatek konzistence v jednotkách koncentrace hemoglobinu je obzvláště problematický, protože zdánlivě podobné koncentrace hemoglobinu získané rozdílnou metodikou mohou vést k velmi rozdílným klinickým interpretacím. Důsledné přijetí mezinárodně uznávané metody pro vykazování výsledků by usnadnilo srovnání výsledků FIT a jejich harmonizaci. Expertní skupina WEO

proto navrhla jednoduchou strategii pro vyjadřování koncentrace hemoglobinu ve stolici přepočítáním hodnoty na koncentraci v $\mu\text{g/g}$ stolice, které umožní srovnávat testy FIT provedené s rozdílnou odběrovou kazetou. Rapi³⁷ se detailně věnuje této preanalytické fázi detekce hemoglobinu ve stolici a prokazuje rozdíl mezi výrobcí deklarovanou hodnotou a metrologicky ověřenou hmotností odebrané stolice v rozsahu od 56 % do 121 %.

Česká společnost klinické biochemie (ČSKB) doporučuje z hlediska kvality a vyhodnocování péče o pacienty a epidemiologické srovnatelnosti výsledků aplikovat v České republice jednotný postup. Stanovení okultního krvácení ve stolici doporučuje provádět výhradně kvantitativními testy FIT a výsledky vyjadřovat koncentrací hemoglobinu ve stolici, tj. v jednotkách $\mu\text{g/g}$ stolice.^{38,39}

EXTERNÍ KONTROLA KVALITY PRO KVANTITATIVNÍ ANALÝZU HEMOGLOBINU

Požadovaná přesnost a správnost 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. Německá studie¹¹ proto zdůrazňuje, že testy POCT, především kvalitativní rapid-testy, nejsou obhajitelné pro screeningový program se zaručenou kvalitou.

Korejská studie⁴⁰ analyzovala kontrolu kvality v roce 2015 mezi 1 250 účastníky. Kvalitativní testy FIT od devíti různých výrobců používalo 569 účastníků (71 %) a úspěšnost správného vyhodnocení negativního vzorku byla pouze 11 %. Kvantitativní testy FIT pomocí sedmi různých analyzátorů používalo 235 účastníků (29 %). Studie zdůrazňuje nutnost změny používaných jednotek na $\mu\text{g/g}$ stolice.

Spolehlivost kvantitativní analýzy zajišťuje v České republice systém externí kontroly kvality podle standardů definovaných v ISO 15189. Společnost SEKK jakožto řádný člen European Committee for External Quality Assurance Programmes in Laboratory Medicine (EQALM) rozvíjí spolupráci s významnými zahraničními poskytovateli EQA. Od ledna 2012 zařadil do programu externího hodnocení kvality program pro okultní krvácení (FOB). Tento kontrolní test je určen výhradně pro kvantitativní stanovení koncentrace hemoglobinu ve stolici. Není určen pro kvalitativní průkaz nebo semikvantitativní stanovení a je nabízen také ve verzi pro POCT analyzátoch. Posledního cyklu v září 2017 se účastnilo již 90 pracovišť, která kvantitativní FIT provádějí.

Poděkování: Za cenné a kritické připomínky k rukopisu děkují prof. MUDr. M. Jirsovi, CSc., z IKEM Praha.

Podpořeno výzkumným projektem RVO-VFN 64165.

LITERATURA

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;49:1374–1403.
2. Zavoral M, Vojtěchová G, Májek O, et al. Populační screening kolorektálního karcinomu v České republice. *Časopis lékařů českých* 2016;155:7–12.
3. EU Council Recommendation of 2 December 2003 on cancer screening. *Official Journal of the European Union* 2003/878/EC.
4. Frič P. The use of Haemocult test in the early diagnosis of colorectal cancer – experience from six pilot studies in Czechoslovakia. In: Hardcastle JV. *Haemocult screening for the early detection of colorectal cancer*. Stuttgart: Schattauer, 1986; s. 73–74.
5. Basu P, Ponti A, Anttila A, et al. Status of implementation and organization of cancer screening in the European Union Member States – summary results from the second European screening report. *Int J Cancer* 2017 Sep 23 [Epub].
6. Navarro M, Nicolas A, Ferrandez A, et al. Colorectal cancer population screening programs worldwide in 2016: An update. *World J Gastroenterol* 2017;23:3632–3642.
7. Pitkaniemi J, Seppä K, Hakama M, et al. Effectiveness of screening for colorectal cancer with a faecal occult-blood test, in Finland. *BMJ Open Gastroenterol* 2015;2:e000034.
8. Young GP, Symonds EL, Allison JE, et al. Advances in Fecal Occult Blood Tests: the FIT revolution. *Dig Dis Sci* 2015;60:609–622.
9. Dvořák M, Kocna P, Vaničková Z. Okultní krvácení ve stolici – srovnání imunochemického a biochemického testu stanovení. *Časopis lékařů českých* 2002;141:217–219.
10. Seifert B, Korcová M, Král N. Variabilita testů na okultní krvácení používaných praktickými lékaři ve screeningu kolorektálního karcinomu v České republice. *Gastroent Hepatol* 2015;69:255–258.
11. Haug U, Becker N. Immunochemical fecal occult blood tests for colorectal cancer screening: Point-of-care tests are not tenable for a quality-assured program. *Dtsch Med Wochenschr* 2016;141:729–731.
12. Holland WW, Stewart S, Masseria C. Screening in Europe-Policy Brief. *European Observatory on Health Systems and Policies, WHO European Centre for Health Policy* 2006; 1–72.
13. Digby J, Fraser CG, Carey FA, et al. Faecal haemoglobin concentration is related to severity of colorectal neoplasia. *J Clin Pathol* 2013;66:415–419.
14. Benton SC, Seaman HE, Halloran SP. Faecal occult blood testing for colorectal cancer

- screening: the past or the future. *Curr Gastroenterol Rep* 2015;17:428.
15. Kelley L, Swan N, Hughes DJ. An analysis of the duplicate testing strategy of an Irish immunochemical FOBT colorectal cancer screening programme. *Colorectal Disease* 2013;15:e512–e521.
 16. Kapidzic A, van Roon AHC, van Leerdam ME, et al. Attendance and diagnostic yield of repeated two-sample faecal immunochemical test screening for colorectal cancer. *Gut* 2017;66:118–123.
 17. Hernandez V, Cubiella J, Gonzalez-Mao MC, et al. Faecal immunochemical test accuracy in average-risk colorectal cancer screening. *World J Gastroenterol* 2014;20:1038–1047.
 18. Castro I, Cubiella J, Rivera C, et al. Faecal immunochemical test accuracy in familial risk colorectal cancer screening. *Int J Cancer* 2014;134:367–377.
 19. Cha JM, Lee JI, Joo KR, et al. Use of a low cut-off value for the faecal immunochemical test enables better detection of proximal neoplasia. *Dig Dis Sci* 2013;58:3256–3262.
 20. Kovářová JT, Zavoral M, Zima T, et al. 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;156:143–150.
 21. Wieten E, Schreuders EH, Nieuwenburg SA, et al. Effects of increasing screening age and faecal hemoglobin cut-off concentrations in a colorectal cancer screening program. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016;14:1771–1777.
 22. Nielsen HJ, Christensen IJ, Andersen B, et al. Serological biomarkers in triage of FIT-positive subjects? *Scand J Gastroenterol* 2017;52:742–744.
 23. Brenner H, Chen H. Faecal occult blood versus DNA testing: indirect comparison in a colorectal cancer screening population. *Clin Epidemiol* 2017;9:377–384.
 24. Calistri D, Rengucci C, Casadei Gardini A, et al. Faecal DNA for noninvasive diagnosis of colorectal cancer in immunochemical faecal occult blood test-positive individuals. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:2647–2654.
 25. Karl J, Wild N, Tacke M, et al. Improved diagnosis of colorectal cancer using a combination of faecal occult blood and novel faecal protein markers. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:1122–1128.
 26. Rutka M, Bor R, Bálint A, et al. Diagnostic accuracy of five different faecal markers for the detection of precancerous and cancerous lesions of the colorectum. *Mediators Inflamm* 2016;doi:10.1155/2016/2492081 [Epub].
 27. Grobbee EJ, Wieten E, Hansen BE, et al. Faecal immunochemical test-based colorectal cancer screening: The gender dilemma. *UEG Journal* 2017;5(3):448–454.
 28. Van Turenhout ST, Oort FA, van der Hulst RW, et al. Prospective cross-sectional study on faecal immunochemical tests: sex specific cut-off values to obtain equal sensitivity for colorectal cancer? *BMC Gastroenterol* 2014;14:217–226.
 29. Suchanek S, Grega T, Ngo O, et al. How significant is the association between metabolic syndrome and prevalence of colorectal neoplasia? *World J Gastroenterol* 2016;22:8103–8111.
 30. Kallenberg FG, Vleugels JL, de Wijkerslooth TR, et al. Adding family history to faecal immunochemical testing increases the detection of advanced neoplasia in a colorectal cancer screening programme. *Aliment Pharmacol Ther* 2016;44:88–96.
 31. Westwood M, Corro Ramos I, Lang S, et al. Faecal immunochemical tests to triage patients with lower abdominal symptoms for suspected colorectal cancer referrals in primary care: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess* 2017;21:1–234.
 32. Quyn AJ, Steele RJ, Digby J, et al. Application of NICE guideline NG12 to the initial assessment of patients with lower gastrointestinal symptoms: not FIT for purpose? *Ann Clin Biochem* 2017 Jan 1. doi:10.1177/0004563217707981 [Epub].
 33. Digby J, Fraser CG, Carey FA, et al. Interval cancers using a quantitative faecal immunochemical test (FIT) for haemoglobin when colonoscopy capacity is limited. *J Med Screen* 2016;23:130–134.
 34. 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* 2015;2:53–59.
 35. Grobbee EJ, Schreuders EH, Hansen BE, et al. Association between concentrations of hemoglobin determined by faecal immunochemical tests and long-term development of advanced colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 2017 Jul 29. doi:10.1053/j.gastro.2017.07.034 [Epub].
 36. Fraser CG, Allison JE, Halloran SP, 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;104:810–814.
 37. Rapi S, Berardi M, Cellai F, et al. Effects of faecal sampling on preanalytical and analytical phases in quantitative faecal immunochemical tests for hemoglobin. *Int J Biol Markers* 2017;32:e261–e266.
 38. Kocna P, Zima T. Stanovisko ke stanovení hemoglobinu ve stolici kvantitativní analýzou. *Klin Biochem Metab* 2015;23:78–81.
 39. Kocna P, Zima T. Doporučení České společnosti klinické biochemie ke správnému používání metody stanovení okultního krvácení ve stolici. *Tempus medicorum* 2015;24:30–31.
 40. Chang-Ho Jeon, A-Jin Lee. Annual report on the external quality assessment scheme for urinalysis and faecal occult blood testing in Korea. *J Lab Med Qual Assur* 2016;38:120–128.