

Kvantitativní imunochemické testy detekce krve ve stolici pro screening kolorektálních tumorů

P. Kocna, T. Zima

ÚVOD

Riziko karcinomu tlustého střeva v populaci v České republice trvale narůstá a v roce 2010 dosáhlo hodnoty 80 na 100 tisíc obyvatel, v evropském srovnání je jednou z nejvyšších hodnot. 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 intermitentně krvácí.

Screeningové programy zahrnují především laboratorní metody detekce okultního krvácení - FOBT (Fecal Occult Blood Test) - TOKS (Test okultního krvácení ve stolici), detekci genetických markerů a ze zobrazovacích metod se ve screeningu uplatňují sigmoidoskopie, kolonoskopie, irigografie, virtuální počítačová kolografie s použitím výpočetní tomografie (CT) či magnetické rezonance (MR).

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. Doporučení EU pro screening a diagnostiku KRCA zahrnují samozřejmě i další podmínky zajištění kvality, včetně systému externí kontroly kvality - EQAS.

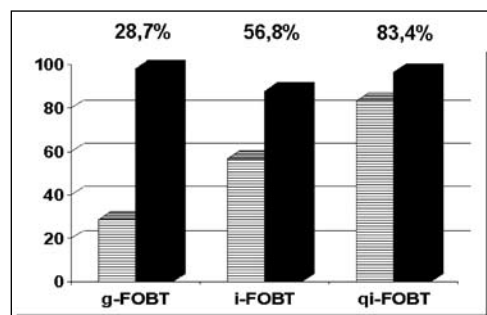
Screening kolorektálního karcinomu (KRCA) má v České republice dlouhou tradici. V letech 1979–1984 byly provedeny pilotní studie s guajakovým testem na okultní krvácení ve stolici (gTOKS), na jejichž základě byl vytvořen národní program screeningu KRCA (Frič 1986). Národní program „Populační screening sporadického KRCA“ byl zahájen 1. 7. 2000 a Česká republika se stala v celosvětovém měřítku druhou zemí, v níž byl takový program přijat. Směrnice pro screening, diagnostiku

a terapii kolorektálního karcinomu byly publikovány v září 1999 a prezentovány na Českém a slovenském gastroenterologickém kongresu v Brně (Ladmanová, Zavoral 1999).

KVANTITATIVNÍ IMUNOCHEMICKÝ TEST (QIFOBT) - TŘETÍ GENERACE TESTŮ TOKS

Doporučeným testem pro screeningový postup byl mnoho let pouze guajakový test, např. Haemocult. Testovací médium (papírek) impregnovaný guajakovou pryskyřicí nebo dimethylbenzidinem (o-tolidin) reaguje změnou barvy v přítomnosti peroxidu vodíku a hemoglobinu, který v této chemické reakci působí svoji pseudoperoxidázovou aktivitou.

Vzhledem k chemickému principu oxidační reakce jsou testy ovlivněny přítomností jiných oxidačních látek (vitamin C), přítomností hemoglobinu z potravy (maso, krev), falešně pozitivní výsledek může být způsoben i přítomností rostlinných peroxidáz (některé druhy kořenové zeleniny). V závislosti na uspořádání testu bylo proto doporučováno definované dietní omezení. Citlivost testů s guajakovou pryskyřicí je velmi nízká 25 - 30 % (obrázek č.1) a guajakové testy proto již nejsou pro screening doporučovány. V roce 2008 bylo v České republice nově diagnostikováno 8 236 pacientů s tímto karcinomem a 4 313 osob na toto onemocnění zemřelo, z toho 46,5 % ve stadiu Dukes III-IV. Screening je prováděn v České republice dle Věstníku Ministerstva zdravotnictví ČR 02/2009, a v roce 2009 byl TOKS test proveden u 282 270 osob, screeningových kolonoskopií z indikace TOKS pozitivita bylo v rozmezí 2009 - 10/2010 provedeno 25 512, s prokázaným KRCA u 1 048 osob, z celkově diagnostikovaných 16 500 je to pouze 6,3 %.



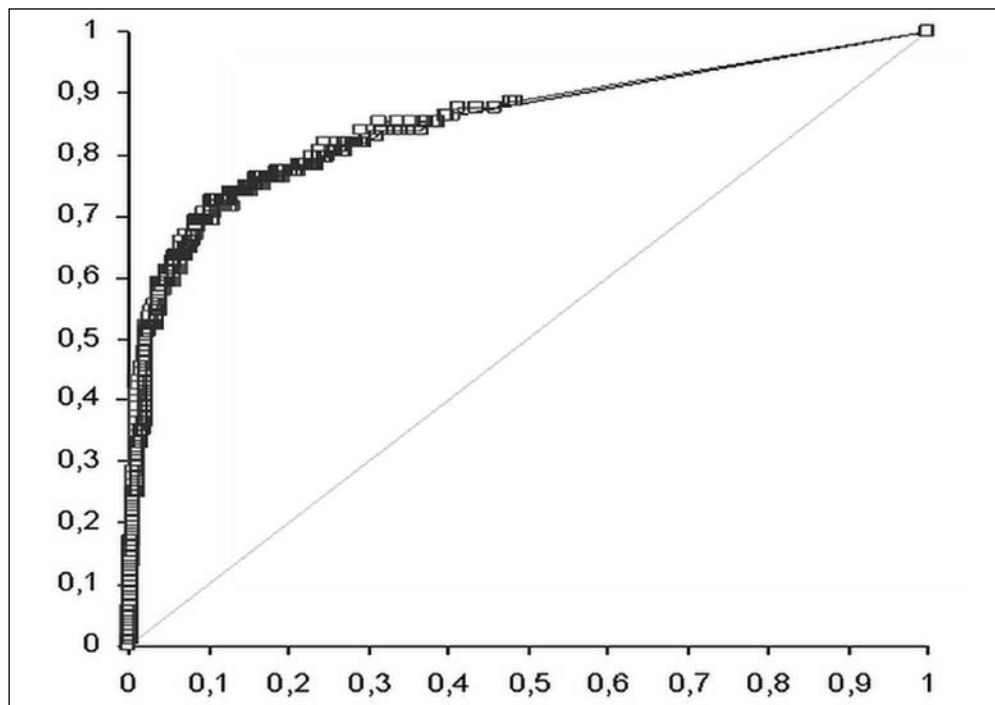
Obrázek č.1 - Tři generace FOBT testů detekce okultního krvácení ve stolici a jejich senzitivita (šrafované) a specifita (plně).

Od roku 2009 je možné vykazovat ve screeningu KRK také imunochemické testy - iFOBT. Imunochemické testy (i-FOBT) je velká nehomogenní skupina nekvantitativních testů, které detekují hemoglobin reakcí s monoklonální protilátkou proti lidskému hemoglobinu a ovlivnění potravou již není žádné, dieta proto není nutná. Vzhledem k menší stabilitě globinu tyto testy nezachycují krvácení z vyšších oddílů gastrointestinálního traktu, např. ze žaludku. Odběr stolice je většinou jednodušší, hygieničtější. Testy mají zhruba 2× vyšší citlivost oproti g-TOKS (obrázek č.1). Na trhu je velké množství různých imunochemických testů, jejich parametry se bohužel značně liší, mnohé používané testy mají naprostou absenci studií dokládajících jejich efektivitu. I přesto řada ambulantních lékařů přešla na jejich provádění z důvodu jasně vyšší citlivosti a komfortnějšího provádění.

Stanovení hemoglobinu ve stolici kvantitativní imunochemickou technologií (qi-FOBT) je v současné době nejpřesnější metodou stanovení okultního krvácení, metodou vhodnou pro screening kolorektálních nádorů - KRCA. Kvantitativní stanovení hemoglobinu koreluje s mírou krvácení prekanceróz (adenomů) a nádorů tlustého střeva. Studie z posledních let porovnávaly několik imunochemických analyzátorů pro kvantitativní stanovení krve ve stolici, většina je japonské výroby.

ROC křivky prokazují specifitu pro karcinomy 95 % při citlivosti 100 ng Hb/mL. 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. (Monoklonální protilátka reaguje pouze s jedním epitopem, polyklonální protilátka reaguje běžně s různými epitopy, protilátka pro tuto analýzu vyžaduje vícenásobnou reakci pro aglutinační aktivitu, tedy mnohanásobnou monoklonální reakci). Vlastní analýza je prováděna turbidimetrickým měřením při 660 nm, kalibrace je většinou několikabodová v rozsahu 20 - 2000 ng Hb/ml.

Kvantitativní analýza umožňuje, oproti kvalitativním - rapid testům - definovat optimální cut-off hodnotu. Informaci, jak nastavit qi-FOBT v české populaci, přinesla studie provedená v předchozích dvou letech ve spolupráci IV. interní kliniky VFN, II. interní kliniky FTN a Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK Praha. Na souboru 815 kolonoskopovaných pacientů byla prokázána senzitivita 73 % a specifita 90 % při provedení jednoho qi-FOBT testu při hraniční hodnotě 75 ng/ml pro skupinu pokročilých polypů a karcinomů (obrázek č. 2).



Obrázek č. 2 - ROC křivka senzitivity a specifity qi-FOBT testu OC-Sensor při provedení jednoho testu (plné body) nebo při hodnocení vyšší hodnoty ze dvou testů (prázdné body), citace - Kovářová 2012.

KONTROLA KVALITY - EHK PRO OKULTNÍ KRVÁCENÍ

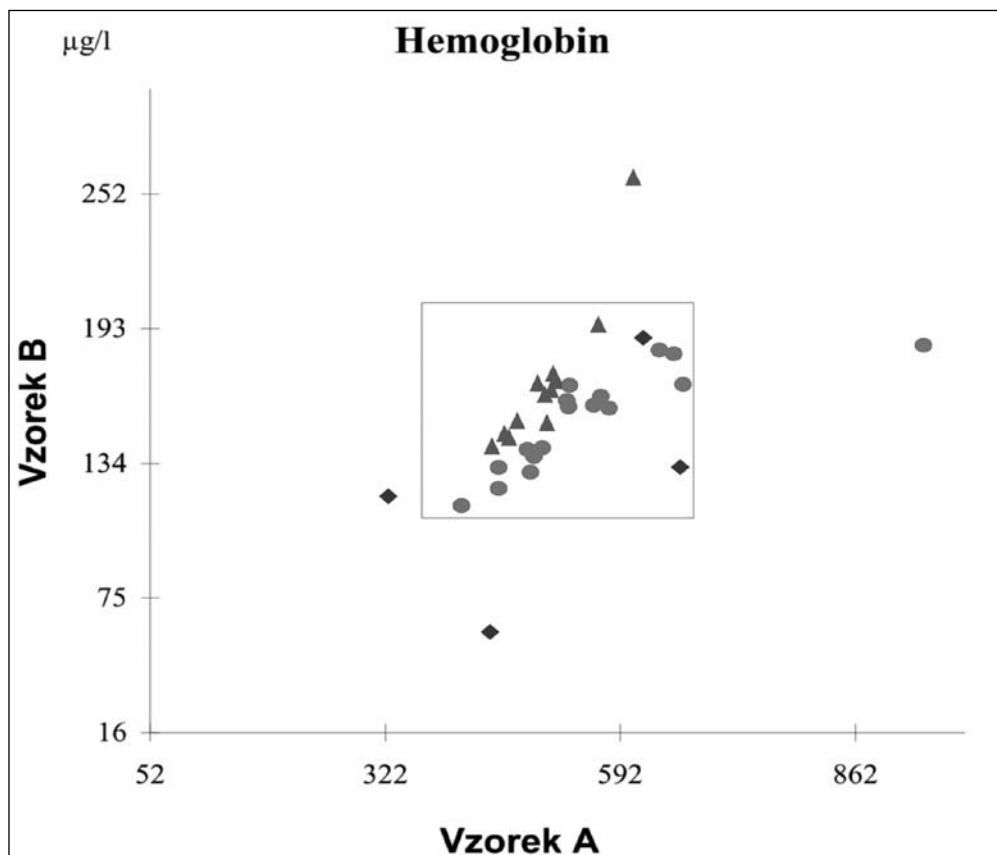
Automatizace laboratorních technologií ovlivnila také vývoj systémů na zpracování vzorků stolice a detekci krve ve stolici. Kvantitativní vyhodnocení může být provedeno u běžných kvalitativních rapid testů pomocí scanneru a PC s vyhodnocovacím softwarem. V nabídce pro praktické lékaře je již několik POCT analyzátorů, které také hodnotí FOB testy.

Doporučení EU pro screening a diagnostiku kolorektálních nádorů zahrnuje samozřejmě doporučení pro zajištění kvality FOBT testů, a to především testů kvantitativních, kde lze tuto externí kontrolu kvality spolehlivě zajistit stejně jako je to zabezpečeno u dalších biochemických analytů. Externí kontrolu detekce Hb ve stolici nabízí v ČR firma SEKK, která jakožto řádný člen European Committee for External Quality Assurance Programmes in Laboratory Medicine (EQALM; <http://www.eqalm.org>) rozvíjí spolupráci s významnými zahraničními poskyto-

vatelem EQA a od ledna 2012 zařadil do programu externího hodnocení kvality (EHK) nový program pro Okultní krvácení (FOB). Tento kontrolní test 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 proběhla v červnu 2011 a první rutinní kontrola, do které se přihlásilo 34 účastníků, byla již realizována v dubnu 2012, qi-FOBT test byl proveden metodou OC-Sensor Eiken, FOB Sentinel a Eurolyser (obrázek č. 3).

KOMISE PRO SCREENING KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU MZ ČR

Rozvoj nových metod detekce krve ve stolici a především FOBT 3. generace testů vyhodnocovaných na automatických analyzátoch je nyní řešen s ohledem na dosavadní doporučení screeningu KRCA Komisí MZ ČR. Rada screeningu KRCA ČGS



Obrázek č. 3 - Polohu výsledků tří skupin, Eiken (trojúhelníčky), Sentinel (kolečka) a Eurolyser (kosočtverečky) v Youdenově grafu. Citace: http://www.sekk.cz/eqa/2012/FOB112_Com.pdf

na svém jednání 16. prosince 2010 hlasováním odsouhlasila, že doporučuje používání kvantitativních FOBT testů. Zasedání Komise pro screening kolorektálního karcinomu MZ ČR 27. dubna 2011 schválilo zástupce České společnosti klinické biochemie ČLS JEP jako řádného člena této komise. Stanovisko výboru ČSKB ČLS JEP k používání qiFOBT-TOKS testu pro screening kolorektálního karcinomu bylo zasláno Komisi MZ ČR 8. června 2011 a Společnost ČSKB nabízí pro screening KRCA v České republice vyhodnocení qiFOBT testů, distribuci qiFOBT kazet praktickým lékařům a zajištění externí kontroly kvality v systému SEKK. Komise MZ ČR 2. listopadu 2011 navrhla ukončení gujakových testů ve screeningu KRCA v České republice k 31. 12. 2012 a tento termín byl potvrzen na posledním zasedání Komise MZ ČR 2. července 2012.

Problematika screeningu KRCA a stanovení okultního krvácení ve stolici se tak výrazně stává naší problematikou, oboru klinické biochemie a naší spoluprací s praktickými lékaři. V každém kraji České republiky alespoň jedno pracoviště nabízí již rutinně qi-FOBT testy a první zkušenosti byly publikovány ve FONSu (Dubská 2009). Naše laboratoř testy zpracovává na Eiken analyzátoru OC-Senzor a nabízíme odbornou pomoc při zavádění této technologie. Edukační videosekvence je zveřejněna na serveru 1. lékařské fakulty - http://ukb.lf1.cuni.cz/cppt/fobt_ocsensor.wmv

LITERATURA

Benešová, A.; Frič, P.; Zavoral, M.; Kocna, P.; Matějovič, F.; Vokráčka, V.; Mareš, K., Srovnání imunochemického a biochemického testu okultního krvácení ve stolici, Čas. lék. čes., 1993, 132, 17, 523-525

Dubská L, Nechvátal J. Kvantitativní stanovení hemoglobinu ve stolici, Laboratorní technologie. FONS 2009, 3: 13-15, (<http://web2.stapro.cz/bull-fons/32009/labo1.pdf>)

Dvořák, M.; Kocna, P.; Vaníčková, Z.: Okultní krvácení ve stolici - srovnání imunochemického a biochemického testu stanovení. Časopis lékařů českých, 2002, 141; 7, 217-219

Ferkl, M.; Kocna, P.; Frič, P., Srovnání stanovení okultního krvácení ve stolici imunochemickou a biochemickou metodou, Časopis lékařů českých, 1992, 131, 5, 149-151

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. Schattauer, Stuttgart, 1986: 73–74.

Frič P.: Kvantitativní imunochemický test krvácení do stolice v populačním screeningu kolorektálního karcinomu. Gastroent Hepatol 2011; 65(3): 157–158

Hol L, Van Leerdam ME, Van Ballegooijen M, van Vuuren AJ, van Dekken H, Reijerink JC, van der Togt AC, Habbema JD, Kuipers EJ. Screening for colorectal cancer; randomised trial comparing guaiacbased and immunochemical faecal occult blood testing and flexible sigmoidoscopy. Gut 2010;59:62–8.

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. s.160, M-A162

Kovářová J. T., Zavoral M., Zima T., Žák A., Kocna P., Kohout P., Granátová J., Vaníčková Z., Vránová J., Suchánek S., Beneš Z., Čelko 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): 143-150

Ladmanová Petra, Zavoral Miroslav: Kolorektální karcinom - screening, diagnostika, léčba. Závazná doporučení efektivní léčebně preventivní péče, Česká a slovenská gastroenterologie. 1999, Roč. 53, č. prosinec, s. 61-63. ISSN: 1210-7824.

Levi Z, Rozen P, Hazazi R et al. A Quantitative immunochemical fial occult blood test for colorectal neoplasia. Ann Intern Med 2007; 146(4): 244–255.

Rossum LG, Rijn AF, Laheij RJ et al. Random comparison of guaiac and immunochemical fecal occult blood tests for colorectal cancer in a screening population. Gastroenterology 2008; 135(1): 82–90.

Zavoral M, Suchanek S, Zavada F et al. Colorectal cancer screening in Europe. World J Gastroenterol 2009; 15(47): 5907–5915.