

Valutazioni preliminari per la proposta di un unico dispositivo di campionamento per la ricerca dell'emoglobina su materiale fecale

Stefano Rapi¹, Callum G. Fraser², Filippo Cellai³, Margherita Berardi¹, Tiziana Rubeca³

¹Laboratorio Generale, Dipartimento Servizi, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze

²Center for Research in Cancer Prevention and Screening, University of Dundee Ninewells Hospital and Medical School, Dundee, Scotland

³Laboratorio Prevenzione Oncologica, Istituto Studio Prevenzione Oncologica, Firenze

ABSTRACT

Preliminary assessments for a standard sampling device for fecal hemoglobin detection. Sampling of feces is strongly affected by the lack of harmonisation, with differences up to 20 times in the mass collected for immunological tests for fecal hemoglobin (Hb) used in colorectal cancer screening. Aim of this study was to acquire information on fecal sampling and on the interaction between feces and analytical methods to obtain a reference design for a sampling dipstick. Bias and imprecision of sample collection dipsticks were estimated using gravimetry. Dissolution times of feces were monitored throughout the study. The effect of increasing amount of feces on Hb concentrations was investigated in saline and buffers of different manufacturers using a single analytical method (OC-Sensor, Eiken Chemical Co.). Fecal mass recovered with different devices ranged from 56 to 121% of declared amount (CV range: 8.6÷31.1%). Time of dissolution up to 2 h was observed when lumps of materials were collected. In saline a rapid decrease of Hb values was observed, which was related to the overall amount of feces. Increased Hb values were observed by adding feces to manufacturers' buffers. Solubilisation time, bias and imprecision of sampling of feces were related to device design. Analytical methods are designed to use specific ratios between feces and buffers. The introduction of a standard dipstick design to reduce preanalytical variability may represent a crucial step for fecal test harmonization.

INTRODUZIONE

In tutti settori della diagnostica di laboratorio, armonizzazione e standardizzazione di metodi e strategie di campionamento e di analisi rappresentano passaggi determinanti per consentire l'acquisizione di un dato analitico corretto, la comparabilità dei risultati ottenuti e una completa comprensione e interpretazione clinica dei valori forniti.

Gli esami su materiale fecale rappresentano una situazione paradigmatica con complicazioni e specificità che la Medicina di Laboratorio ha ignorato quasi completamente per lungo tempo, dalla comparsa dei primi esami su feci fino al 2012, quando alcuni autorevoli interventi dei colleghi del "Working Group on Fecal Immunochemical Tests (FIT) for Hemoglobin" sulla letteratura internazionale (1) e nel corso degli incontri periodici a margine dei congressi della "World Endoscopy Organisation" (WEO) (2) hanno richiamato l'attenzione del mondo scientifico sui test immunologici

per la determinazione dell'emoglobina fecale (FIT-Hb). I FIT-Hb sono ampiamente utilizzati già da molti anni nei programmi di screening delle neoplasie del colon-retto in Giappone (3) e in Europa (4) e sono indicati come esami di primo livello per lo screening dalle linee guida europee (5).

Una breve storiografia di questa tipologia di esami può essere utile a definire meglio l'impatto che ha avuto la disattenzione del mondo della Medicina di Laboratorio e spiegare perché possiamo considerare paradigmatica tale situazione. I primi metodi commerciali per la ricerca del sangue occulto su materiale fecale furono i test al guaiaco (6), nei quali questo agente chimico reagisce con l'attività perossidasi dell'Hb. In presenza di perossido di idrogeno si ha l'ossidazione dell'acido α -guaiacconico (un composto fenolico) in una struttura chinonica, con sviluppo di colore blu per reazione intramolecolare. Il metodo può essere eseguito su "card" e utilizzato come "point of care test" (POCT) con

Corrispondenza a: Stefano Rapi, Laboratorio Generale, Dipartimento Servizi, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Largo Brambilla 3, 50135 Firenze. Tel. 0557945178, Fax 0557945178, E-mail rapis@aou-careggi.toscana.it

Ricevuto: 17.06.2015

Revisionato: 29.07.2015

Accettato: 30.07.2015

potenziali problemi di standardizzazione. Dopo i test al guaiaco sono diventati disponibili i test immunologici di tipo qualitativo basati su emoagglutinazione ("reverse passive hemagglutination", RPHA) (7), che hanno comportato vantaggi rispetto ai test al guaiaco, soprattutto non richiedendo restrizioni alimentari.

Il trasferimento della strategia analitica da metodiche qualitative a metodi quantitativi inseriti all'interno di un processo di laboratorio standardizzabile e qualitativamente controllabile, si è rivelato estremamente complesso ed è giunto a termine soltanto con le indicazioni contenute nelle linee guida europee del 2010 (5), che hanno costretto anche le più prestigiose riviste anglosassoni a rivedere le proprie indicazioni, fino a quel momento molto più indirizzate verso l'utilizzo di test al guaiaco e di test immunologici su "card" che verso test immunologici quantitativi. È interessante notare come le maggiori resistenze siano scaturite dai modelli dei sistemi sanitari più che dalle evidenze scientifiche, che nel tempo si erano accumulate a favore dell'inserimento del test all'interno di processi diagnostici centralizzati e organizzati. Evidenze scientifiche che oggi portano a definire una "rivoluzione" l'utilizzo dei FIT-Hb nei processi di screening (8, 9).

L'indicazione delle linee guida europee delle metodiche analitiche immunologiche quantitative (FIT-Hb), con cut-off variabile, come strategia elettiva di I livello dello screening e la sempre maggiore importanza che stanno assumendo altri esami su materiale fecale (ad es., la calprotectina come indicatore di flogosi intestinale), spingono oggi a riconsiderare in dettaglio lo stato dell'arte e le diverse fasi del processo che impiega questa tipologia di materiale biologico. Le indicazioni del Gruppo di Lavoro WEO "FIT for screening" hanno focalizzato i punti di partenza per rendere confrontabili le risposte ottenute dalle diverse metodiche analitiche disponibili per FIT-Hb e, di conseguenza, le informazioni epidemiologiche ottenute dai programmi di screening. L'evidenza di partenza è che i metodi di campionamento, la massa delle feci raccolte, il volume e le caratteristiche del tampone utilizzati nei dispositivi di campionamento differiscono tra le metodiche analitiche presenti sul mercato. In assenza di indicazioni da parte di enti certificatori o di società scientifiche, le aziende produttrici hanno infatti messo a punto dispositivi di campionamento estremamente diversi e utilizzato rapporti feci/tampone metodo-specifici, che rendono i risultati strettamente dipendenti dal metodo (10, 11).

Oltre a questa evidenza esistono altri problemi peculiari legati alle caratteristiche del materiale biologico e all'analisi in esso disperso:

- a) consistenza e caratteristiche fisico-chimiche del materiale biologico sono legati all'alimentazione e alle risposte fisiologiche individuali;
- b) la dispersione del materiale biologico all'interno del tampone non può essere omogenea;
- c) nel caso specifico della ricerca dell'Hb fecale, un'ulteriore fonte di variabilità è legata all'intermittenza del sanguinamento dovuta alla

tipologia stessa della lesione.

Queste problematiche sono state da noi precedentemente dettagliate (12) e la ricerca di una soluzione a questi problemi ci ha spinto a progettare uno studio sulla standardizzazione dei dispositivi di prelievo del materiale fecale. Questa pubblicazione riporta le indicazioni ottenute dalle informazioni raccolte durante le prime fasi dello studio, finalizzate a inquadrare sistematicamente le problematiche specifiche legate alla raccolta del materiale e all'aggiunta di materiale fecale all'ambiente di reazione, aspetti affrontati anche dalle aziende al momento della produzione dei dispositivi e risolte con lo sviluppo di disegni e tamponi specifici destinati a costituire un complesso organico solo parzialmente confrontabile con quanto prodotto dalla concorrenza.

MATERIALI E METODI

Nello studio sono stati inclusi i dispositivi di prelievo disponibili in Italia per i FIT-Hb quantitativi. In dettaglio, quelli relativi ai sistemi OC-Sensor (Eiken Chemical Co.), NS-Plus (Alfresa Pharma CO), HM-JACKarc (Kyowa Medex CO) e FOB-GOLD (Sentinel CH).

La prima fase è stata quella di raccogliere le informazioni relative ai dispositivi di campionamento e alla fase preanalitica, fornite dalle aziende produttrici e reperibili in letteratura. La ricerca bibliografica ha portato all'individuazione di 3 soli riferimenti contenenti informazioni indipendenti sulla fase preanalitica (13-15).

La valutazione sperimentale della quantità di materiale fecale raccolto è stata effettuata indagando il "bias" e l'imprecisione dei vari dispositivi, eseguendo una serie di 8 campionamenti per ogni dispositivo su 3 materiali fecali di diversa consistenza.

La quantità di materiale raccolto è stata ottenuta per pesata (Mettler AE 240; intervallo analitico: 0-40 g, incertezza: 0,01 mg), utilizzando un protocollo di campionamento analogo a quello proposto dal "NHS Bowel Cancer Screening Programme" (13), che ha riportato una prova analoga eseguita su amido di riso. La strategia di misurazione del materiale raccolto è basata su: 1) apertura e allontanamento del tampone dai flaconi; 2) taglio e pesata della parte terminale dell'asta di prelievo dopo inserimento nel dispositivo per eliminazione del materiale in eccesso; 3) lavaggio ed essiccazione del frammento di asta di campionamento e nuova pesata per la determinazione della tara.

Al fine di comprendere le relazioni esistenti tra disegno delle aste di campionamento, quantità di materiale fecale e solventi utilizzati, e i tempi di dissoluzione del materiale biologico, sono state condotte una serie di verifiche specifiche registrando i tempi di solubilizzazione del materiale in NaCl e nei tamponi commerciali.

L'effetto di concentrazioni crescenti di materiale fecale sul segnale dell'Hb è stato studiato aggiungendo feci a soluzioni di Hb in tamponi diversi. Le concentrazioni crescenti di feci sono state aggiunte utilizzando i dispositivi di prelievo HM-JACKarc (atteso:

2 mg) e OC-Sensor (10 mg) a 2 mL di soluzione.

L'effetto della quantità delle feci sul segnale dell'Hb è stato studiato utilizzando i diversi solventi e sviluppando la reazione col sistema OC-Sensor. La verifica degli effetti della quantità di materiale fecale sulla degradazione dell'Hb è stata eseguita aggiungendo differenti quantità di materiale biologico a una soluzione di Hb disciolta in soluzione fisiologica e studiando l'andamento del segnale nelle prime 24 ore.

Data la stretta relazione esistente tra fase analitica e preanalitica dei diversi metodi commerciali, soltanto i dati forniti dal sistema OC-Sensor risultano quantitativi (16) e sono stati utilizzati per le prove di recupero e lo studio dettagliato delle variazioni del segnale all'aggiunta di materiale fecale. Il valore teorico è stato ottenuto considerando come valore atteso (100%) quello ottenuto per calcolo partendo dalla concentrazione di Hb fornita dall'esame emocromocitometrico, lisi dei globuli rossi in acqua distillata, diluizioni scalari in NaCl e diluizione finale nel tampone metodo-specifico. Gli altri risultati sono stati analizzati come variazioni percentuali del segnale nel tempo rispetto al valore iniziale prima dell'aggiunta di feci. Ogni punto è stato ottenuto come media di una doppia determinazione.

La stabilità del sistema analitico durante lo studio è stata verificata con due livelli di controllo a titolo noto della ditta Eiken (CQ Control LV1 e LV2)

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando i programmi disponibili su Excel 2010 (Microsoft).

RISULTATI

I valori teorici di campionamento dei dispositivi di prelievo, forniti dalle aziende produttrici, quelli riportati negli studi sperimentali reperibili in letteratura (13, 14), il recupero medio percentuale rispetto al valore dichiarato dall'azienda produttrice e i CV ottenuti con i diversi dispositivi su materiale fecale diversamente strutturato sono riportati nella Tabella 1.

I tempi di dissoluzione del materiale fecale nei diversi tamponi, con le diverse aste di campionamento hanno mostrato delle differenze estremamente ridotte tra i diversi tamponi, con un tempo totale di dissoluzione compreso tra 20 e 30 min per tutti i campionamenti. Una differenza significativa si è osservata per l'asta di prelievo dell'HM-JACKarc, basata su specifiche tasche di raccolta, che necessita di tempi di dissoluzione nettamente più lunghi (fino a 120 min).

Nella Tabella 2 sono riportate le variazioni percentuali del segnale dell'Hb in NaCl nelle prime 24 ore dopo l'aggiunta di materiale fecale.

I risultati ottenuti con le prove di recupero dell'Hb, utilizzando il tampone metodo-specifico, rispetto al valore teorico e la modifica del segnale all'aggiunta di concentrazioni crescenti di feci sono riportate nella Figura 1. Le variazioni del segnale dell'Hb all'aggiunta di quantità crescenti di feci in tre diversi tamponi sono riportate nella Figura 2.

Media e DS del materiale di controllo sul sistema analitico utilizzato (OC-Sensor) nel periodo di studio

sono risultati: $119 \pm 1,12 \mu\text{g/L}$ (LV1) e $386 \pm 4,21 \mu\text{g/L}$ (LV2) (intervalli di accettabilità indicati dall'azienda produttrice sul sistema utilizzato: LV1, $104 \pm 150 \mu\text{g/L}$ e LV2, $368 \pm 398 \mu\text{g/L}$)

DISCUSSIONE

Le informazioni raccolte in questo studio avevano lo scopo di consentirci una valutazione più completa e articolata delle associazioni esistenti tra forma e disegno del dispositivo di campionamento e materiale da campionare e degli effetti della matrice fecale sui segnali analitici e la stabilità dell'analita.

Come era ipotizzabile, sia l'accuratezza che l'imprecisione dei dispositivi di prelievo variano in maniera significativa in funzione della composizione del materiale raccolto e del disegno del dispositivo utilizzato, contribuendo in maniera significativa alla variabilità dei risultati analitici forniti dagli esami su materiale fecale.

Dopo il campionamento, i tempi di dissoluzione del materiale risultano legati alla forma del dispositivo di campionamento e possono rivelarsi estremamente lunghi (oltre 2 ore) in presenza di "grumi" di materiale anche di piccole dimensioni (<1 mg di peso). Il materiale disperso ha inoltre numerosi effetti sulle condizioni del mezzo (colore, pH, forza ionica, presenza di fibre insolubili), che sono state affrontate in maniera specifica dalle aziende e hanno portato alla creazione di sistemi prelievo/dosaggio strettamente connessi per i quali non è possibile acquisire informazioni con i protocolli di confronto tra metodi normalmente utilizzati (16). L'effetto dello sviluppo di tecniche di raccolta metodo-specifiche ha portato a differenze fino a 20 volte nel rapporto tra materiale campionato e tampone di diluizione (2).

La strategia proposta dal "Working Group on FIT for hemoglobin screening" di riportare i dati in $\mu\text{g Hb/g feci}$ costituisce sicuramente un approccio utile per rendere comparabili i dati scientifici, ma non può avere alcun effetto in termini di armonizzazione finale del dato di laboratorio. L'armonizzazione della fase preanalitica degli esami su materiale fecale può essere ottenuta introducendo una tipologia unica di dispositivo di campionamento in grado di assicurare la stessa accuratezza e imprecisione in presenza di materiale ugualmente formato. Un'indicazione del genere dovrà tuttavia essere fortemente condivisa a livello scientifico e avvallata da una normativa specifica, che la renda vincolante per le aziende operanti in Europa.

La standardizzazione della fase analitica è legata all'introduzione di standard univoci di riferimento, indicazione che nel caso specifico di esami quantitativi per l'Hb potrebbe risultare relativamente semplice, data l'esistenza di materiali di riferimento per l'analita in questione e la buona risposta fornita dalle nostre prove di recupero. Non è tuttavia possibile eliminare il "bias" dovuto alla composizione chimico-fisica del materiale, che è legata alla dieta e alla fisiologia del singolo soggetto, così come non potremo eliminare la disomogeneità delle risposte dovuta all'intermittenza del sanguinamento e alla mancanza di omogeneità nella

Tabella 1

Accuratezza di campionamento dei dispositivi di prelievo utilizzati nei test immunologici per la determinazione dell'emoglobina fecale (FIT-Hb) commerciali valutati

| Dispositivo | Teorico ^a (mg) | Halloran ^b (mg) | GMEC ^c (mg) | Recupero medio (CV) ^d | | |
|-------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------|----------------------------------|-------------|--------------|
| | | | | Prova 1 | Prova 2 | Prova 3 |
| OC-Sensor | 10 | 15 | 11,2 | 76% (13,2%) | 97% (11,9%) | 78% (9,7%) |
| HM-JACKarc | 2 | 4 | 1,95 | 112% (21,3%) | 121% (8,6%) | 116% (14,7%) |
| NS-Plus | 10 | 14 | 9,5 | 56% (30,4%) | 79% (23,4%) | 77% (11,7%) |
| FOB-GOLD | 10 | 16 | 10,0 | 72% (31,1%) | 87% (25,5%) | 92% (14,4) |

^aQuantità di feci recuperate secondo le dichiarazioni dell'azienda produttrice.

^bValori riportati nel rif. 14.

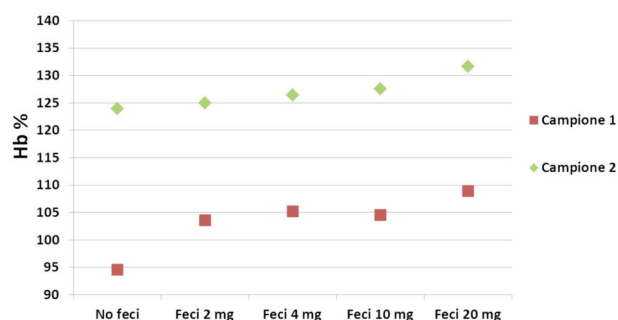
^cValutazione del "Guildford Medical Device Evaluation Centre" (GMEC) (13).

^dProve con materiale fecale diversamente strutturato. I valori riportano il recupero medio percentuale rispetto al valore dichiarato dall'azienda produttrice e il CV di una sequenza di 8 campionamenti sullo stesso materiale.

Tabella 2

Variatione percentuale rispetto al valore iniziale del segnale dell'emoglobina nelle prime 24 ore dopo aggiunta di feci in soluzione fisiologica

| Dispositivo | Feci (atteso) | Basale | 15 min | 60 min | 300 min | 24 ore |
|-------------|---------------|--------|--------|--------|---------|--------|
| HM-JACKarc | 2 mg | 100% | 39% | 41% | 35% | 28% |
| OC-Sensor | 10 mg | 100% | 39% | 25% | 18% | 17% |

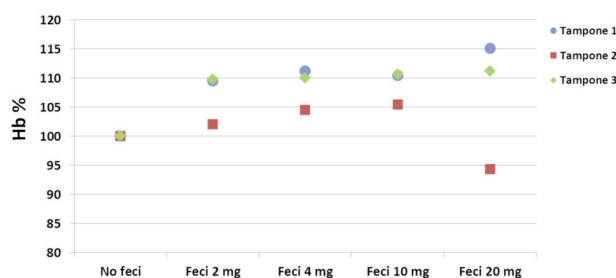
**Figura 1**

Effetti dell'aggiunta di quantità crescenti di materiale fecale sul segnale dell'emoglobina (Hb) utilizzando il tampone metodo specifico. Le variazioni sono riportate come recupero % rispetto al valore atteso, ottenuto dal valore dell'Hb nell'emocromo dopo lisi dei globuli rossi, diluizioni scalari in soluzione fisiologica e diluizione finale nel tampone metodo specifico.

Valori attesi: Campione 1, 433 µg/L, Campione 2, 470 µg/L. Ogni punto riporta il valore medio di due determinazioni.

distribuzione di Hb nel materiale.

In conclusione, per gli esami su feci l'armonizzazione della fase preanalitica mediante l'introduzione di un'unica tipologia di asta di prelievo si presenta come un prerequisito fondamentale per assicurare uniformità e comparabilità dei dati epidemiologici attualmente non perseguibili. Riteniamo che l'armonizzazione dei dispositivi di prelievo possa essere un obiettivo raggiungibile e che gli sforzi in questa direzione siano assolutamente legittimi, nonostante che questo sia solo uno dei punti critici evidenziati per questa tipologia di

**Figura 2**

Effetti dell'aggiunta di quantità crescenti di materiale fecale sul segnale dell'emoglobina (Hb) in 3 tamponi commerciali. I valori sono riportati come recupero % rispetto al valore iniziale. Ogni punto riporta il valore medio di due determinazioni.

esami. In tal modo, si potrebbe contribuire a ridurre la variabilità complessiva del processo preanalitico e analitico e la dispersione delle risposte fornite dai vari metodi, agevolando la confrontabilità dei risultati, la comparabilità dei dati epidemiologici e favorendo l'uniformità delle risposte fornite da popolazioni dislocate in aree geografiche distanti (17).

RINGRAZIAMENTI

Lavoro supportato da SIBioC - Medicina di

Laboratorio, Bando progetti scientifici in tema di armonizzazione.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Fraser CG, Allison JE, Halloran SP, et al. 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;104:810-4.
2. <http://www.worldendo.org/weo-crcsc-expert-working-group-fit-for-screening.html>.
3. Saito H, Soma Y, Koeda J, et al. Reduction in risk of mortality from colorectal cancer by fecal occult blood screening with immunochemical hemagglutination test. A case-control study. *Int J Cancer* 1995;61:465-9.
4. Altobelli E, Lattanzi A, Paduano R, et al. Colorectal cancer prevention in Europe: burden of disease and status of screening programs. *Prev Med* 2014;62:132-41.
5. Segnan N, Patnick J, von Karsa L, eds. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis, 1st ed. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2010.
6. Mandel JS, Bond JH, Church TR, et al. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. *N Engl J Med* 1993;328:1365-71.
7. Zappa M, Castiglione G, Grazzini G, et al. Effect of faecal occult blood testing on colorectal mortality: results of a population-based case-control study in the district of Florence, Italy. *Int J Cancer* 1997;73:208-10.
8. Young GP, Symonds EL, Allison JE, et al. Advances in fecal occult blood tests: the FIT revolution. *Dig Dis Sci* 2015;60:609-22.
9. Allison JE, Fraser CG, Halloran S, et al. Quality indicators and benchmarks for guideline-recommended fecal occult blood tests, Chapter 4. In: Shaukat A, Allen JI, eds. *Colorectal cancer screening*. New York: Springer Science+Business Media, 2015.
10. Allison JE, Fraser CG, Halloran SP, et al. Comparing fecal immunochemical tests: improved standardization is needed. *Gastroenterology* 2012;142:422-4.
11. Fraser CG, Allison JE, Young GP, et al. A standard for faecal immunochemical tests for haemoglobin evaluation reporting (FITTER). *Ann Clin Biochem* 2014;51:301-2.
12. Rapi S, Rubeca T, Fraser CG. How to improve the performances of Fecal 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:e127-31.
13. Carroll MRR, Piggott C, Pearson S, et al. Evaluation of quantitative faecal immunochemical tests for haemoglobin. Guildford, UK: Guildford Medical Device Evaluation Centre (GMEC), 2013.
14. Halloran S. WEO CRC SC Meeting DDW 2012 http://www.worldendo.org/assets/downloads/pdf/resource_s/ccsc/2012/02_StephenHalloran_FITforScreening.pdf.
15. Guittet L, Elodie Guillaume E, Levillain R, et al. Immunochemical fecal occult blood. Analytical comparison of three quantitative tests for colorectal cancer screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20:1492-501.
16. Rubeca T, Cellai F, Confortini M, et al. Impact of preanalytical factors on fecal immunochemical tests: need for new strategies in comparison of methods. *Int J Biol Markers* 2015;30:e269-74.
17. Fraser CG, Rubeca T, Rapi S, et al. Faecal haemoglobin concentrations vary with sex and age, but data are not transferable across geography for colorectal cancer screening. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:1211-6.