

I test per la ricerca del sangue occulto (FOBT): aspetti laboratoristici

Napoli 13 dicembre 2006

**CENTRO DI RIFERIMENTO REGIONALE TOSCANO
PER GLI SCREENING ONCOLOGICI – CRR
CSPO Istituto Scientifico della Regione Toscana**

T. Rubeca U.O. Citologia Analitica e Biomolecolare

IPOSTESI SULLA GENESI DEL SANGUINAMENTO COLORETTALE

Aumento delle dimensioni del polipo

Aumento dell'area superficiale

Aumento del numero delle zone microerose

Diminuzione dello spessore epiteliale

Comparsa di FOBT positivo

NATURA E DISTRIBUZIONE NELLE FECI DEI DERIVATI DELL' Hb FECALE PROVENIENTI DA DIVERSE LOCALIZZAZIONI

Derivato	Stomaco	Colon prossimale	Colon distale
Emoglobina Intatta	—	+	+ +
Eme intatta	+	+	+ +
Porfirina Eme-derivata	+ + +	+ +	+

TEST AL GUAIAACO

Questo test utilizza un agente chimico che reagisce con l'attività perossidasi dell' HB. In presenza di perossido di idrogeno si ha l'ossidazione dell' acido alfa-guaiaconico (un composto fenolico) in una struttura chinonica con sviluppo di colore blu per reazione intramolecolare.

TEST RPHA (reverse passive haemoagglutination)

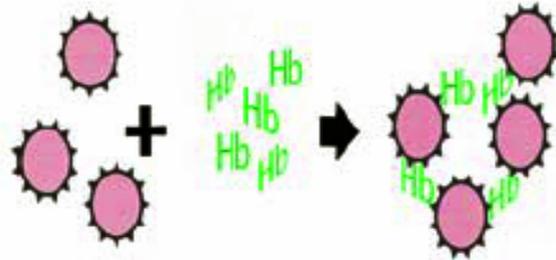
Eritrociti di pollo ricoperti di anticorpi anti-emoglobina umana che si agglutinano in presenza di Hb umana di campioni fecali, risultati visibili in 30', leggibili fino a 1h.

TEST AL LATTICE

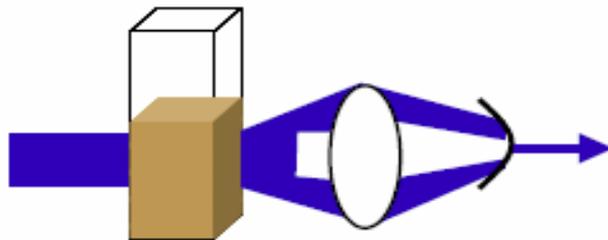
Test in agglutinazione con sferette di lattice ricoperte di anticorpi policlonali anti-Hb umana.

PRINCIPIO DEL TEST

particelle al lattice di polistirene coattate con anti emoglobina umana vengono miscelate con il campione, gli anticorpi reagiscono con l'antigene agglutinando il lattice

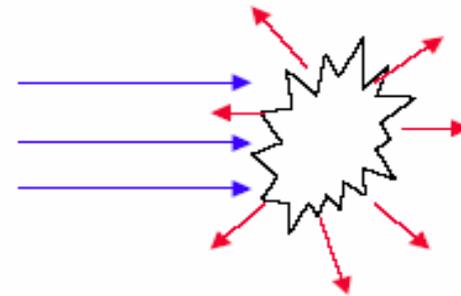


l'agglutinazione porta ad un cambiamento della torbidità



essendoci proporzionalità diretta tra la concentrazione di antigene e l'aumento della torbidità, è possibile calcolare fotometricamente la concentrazione di emoglobina

una radiazione luminosa che colpisce una soluzione di molecole di immunocomplessi viene diffusa proporzionalmente alla concentrazione di aggregati presenti



l'entità della luce diffusa viene misurata ed espressa in mV

interpolando questo dato ad curva di calibrazione, ottenuta utilizzando uno standard a concentrazione nota di Hb, è possibile esprimere la concentrazione in ng/ml di tampone



I TEST IMMUNOLOGICI

- immunodiffusione
- emoagglutinazione
- metodiche E.L.I.S.A.
- agglutinazione al lattice
- immunocromatografia

Test Immunologico di Agglutinazione al Lattice

Vantaggi analitici

- **Anticorpi specifici per globine umane** nessuna interferenza da dieta o farmaci
- **Utilizzabili su strumenti dedicati o di alta automazione** grande numero di test eseguibili in maniera standardizzata con alti livelli di qualità
- **Abbattimento tempi/costi gestione**

Test Disponibili in Italia

OC Sensor Micro

Sistema dedicato, presente da maggior tempo sul mercato, buon numero studi clinici.

FOB Gold

Test compatibile strumenti Chimica Clinica, recente presentazione, primi studi clinici

Olympus

Sistema dedicato, ultimissima presentazione studi clinici non reperiti.

AGGLUTINAZIONE AL LATTICE

- ❑ Metodo quantitativo
- ❑ Tecnica automatica
- ❑ Controllo di qualità

AGGLUTINAZIONE AL LATTICE

L'introduzione di metodiche quantitative ha introdotto la possibilità di scegliere il cut-off di positività più adeguato agli scopi dello screening

AGGLUTINAZIONE AL LATTICE

Rispetto a metodiche precedenti:

- ❑ Maggiore facilità di campionamento da parte del soggetto
- ❑ Maggiore standardizzazione della quantità di materiale prelevato
- ❑ Riduzione del numero dei prelievi inadeguati
- ❑ Igiene del prelievo, con disponibilità di apposito contenitore. Il campione correttamente confezionato è stabile per 5 giorni a temperatura ambiente (25°C) e per una settimana a 2°-8°C
- ❑ Riduzione dei tempi di lavoro

**1) STANDARDIZZAZIONE DEL CAMPIONAMENTO E
CONSERVAZIONE**

2) AUTOMAZIONE STRUMENTALE

3) IMPIEGO DEL LATTICE

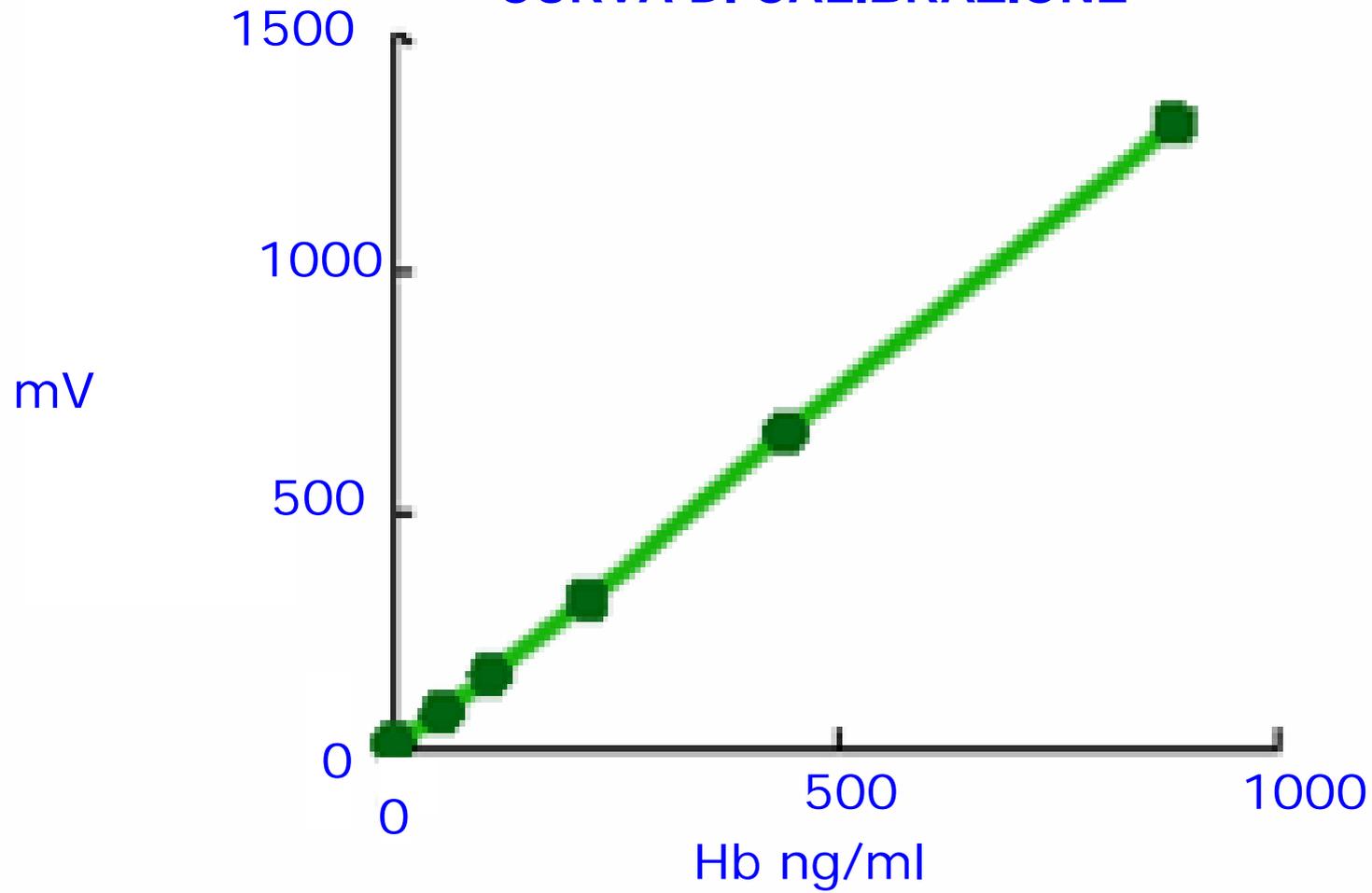
4) CONTROLLO DI QUALITA'

5) CURVA DI CALIBRAZIONE

CURVA DI CALIBRAZIONE

standard 1	0ng/ml (0ng/ml)
standard 2	60ng/ml (61ng/ml)
standard 3	121ng/ml (119ng/ml)
standard 4	234ng/ml (234ng/ml)
standard 5	468ng/ml (467ng/ml)
standard 6	936ng/ml (936ng/ml)

CURVA DI CALIBRAZIONE



CRITERI DI ACCETTABILITA' DELLA CURVA DI TARATURA

LA DIFFERENZA TRA IL VALORE TEORICO E QUELLO OTTENUTO DEVE ESSERE PER:

- STD2: $\pm 10\%$
- STD3/STD6: $\pm 5\%$

QUANDO CONVIENE
RICALIBRARE LA CURVA

- Quando i controlli non rientrano nel range di accettabilità
- Quando si cambia il lotto del lattice
- Una volta al mese in caso di alte routine
- quando il lattice è stato conservato a bordo dello strumento per più di 1 settimana

STABILITA' DEL LATTICE

Ogni flaconcino è sufficiente per 100 test

Se conservato in frigorifero, una volta
aperto,
è stabile per 2 settimane

A bordo dello strumento, a temperatura
ambiente, 1 settimana.

Suggerimenti

- Non mescolare il lattice di 2 flaconcini anche se appartenenti allo stesso n° di lotto
- Non mescolare mai il buffer di due flaconi

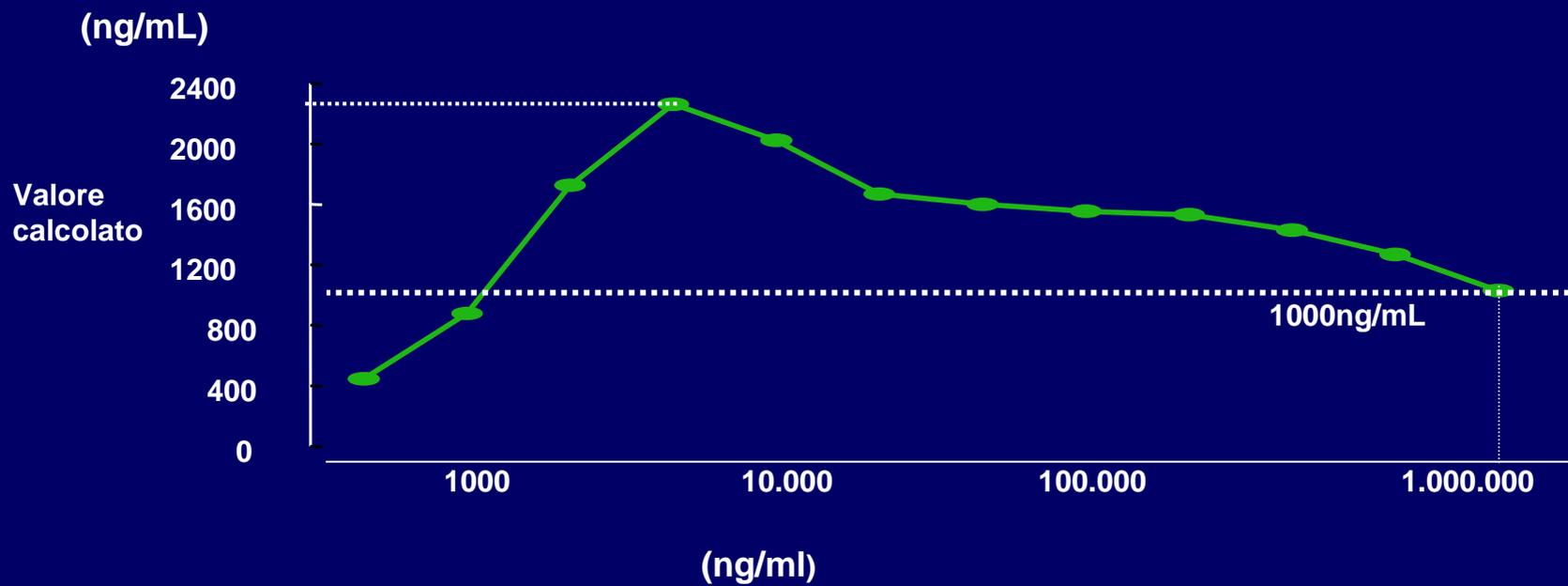
Effetto PROZONA

Situazione che si verifica in presenza di un eccesso di antigene in relazione alla concentrazione anticorpale.

Ciò causa una diminuzione della reattività apparente ed una sottostima della quantità antigenica

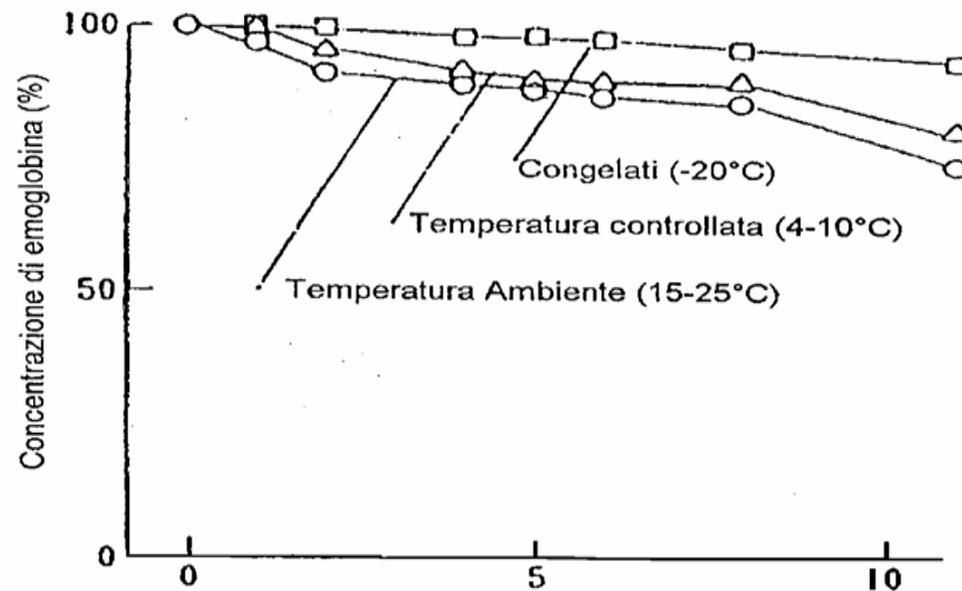
Analisi dei dati

Effetto prozona



STABILITA' DEI CAMPIONI

Con l'impiego dei flaconcini di prelievo



- Organizzare le fasi di raccolta e conservazione dei campioni, a seconda delle priorità stabilite, in modo che campioni di differente origine abbiano uno stesso trattamento pre-analitico
- organizzare la tempistica del dosaggio
- ridurre il più possibile la variabilità analitica
- assicurarsi che sia automatica la procedura positivo vs colonscopia
- fare il possibile per avere il riscontro degli approfondimenti in tempi brevi

AGGLUTINAZIONE AL LATTICE

L'introduzione di metodiche quantitative ha introdotto la possibilità di scegliere il cut-off di positività più adeguato agli scopi dello screening

Per lo screening il cut-off consigliato
è di 100ng/ml

INDICATORI

- Partecipazione
- Percentuale di positivi
- Detection rate per cancro
- Detection rate per adenoma ad alto rischio
- Valore predittivo positivo per cancro
- Valore predittivo positivo per adenoma di alto rischio

CONFRONTI FRA TEST

Casistica storica CSPO su 5.415 soggetti invitati allo screening

	HEMOCCULT	1-day RPHA
Positivity rates	7 %	3,5 %
Dr per cancro	2,4‰	2,8 ‰
Dr per adenomi > 9 mm	6,9 ‰	6,6‰
V.P.P. per cancro	4,0 %	9,5%
V.P. P. per adenomi > 9 mm	11,4 %	22,3%
Specificità per cancro	93,2%	96,7%

1-day RPHA vs 1-day Latex Agglutination test

5.844 soggetti (50-70 aa)

	RPHA	Lattice 100 ng /ml	Lattice 150 ng/ml	Lattice 200 ng /ml
Positivity rate	3,3 %	3,5%	2,5 %	2 %
Detection rate per k	2,9 ‰	2,7 ‰	2,6 ‰	2,4 ‰
Detection rate per adenomi > 9 mm	4,8 ‰	5,5 ‰	5,0 ‰	4,3 ‰
Specificità per k	97,0 %	96,7 %	97,7 %	98,2 %
Valore predittivo per k cancro	10,2 %	8,8 %	11,5 %	13,9 %
Valore predittivo per adenomi > 9 mm	16,8 %	17,6 %	22,3 %	24,8 %

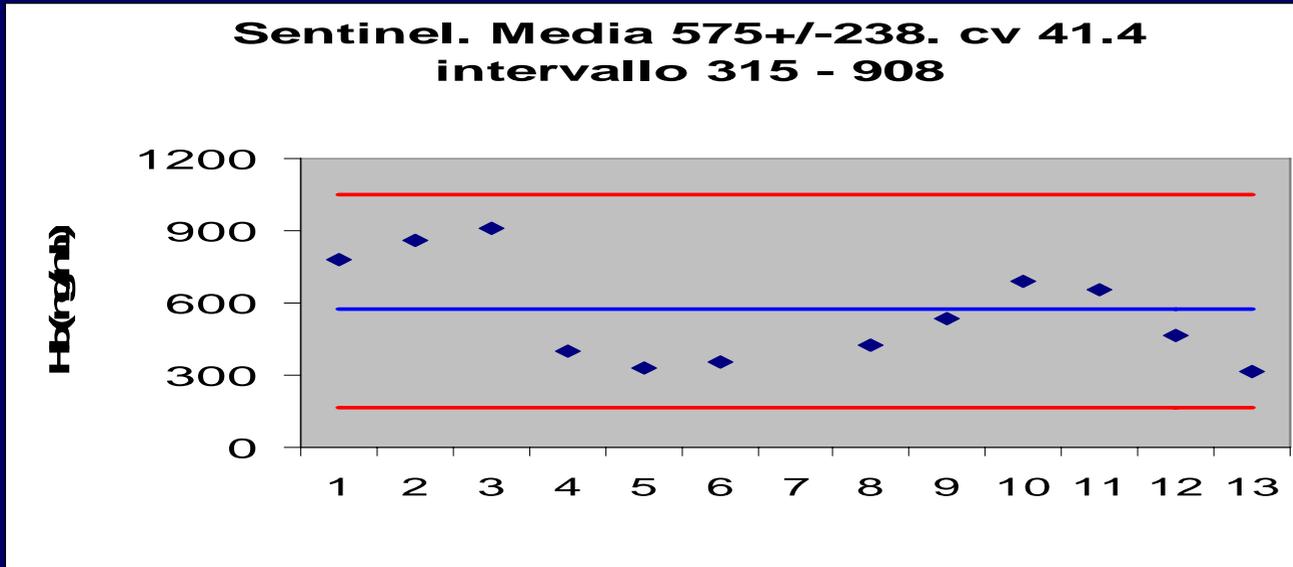
Variabilità biologica della matrice

Le feci hanno una composizione molto variabile, da soggetto a soggetto e nello stesso soggetto.

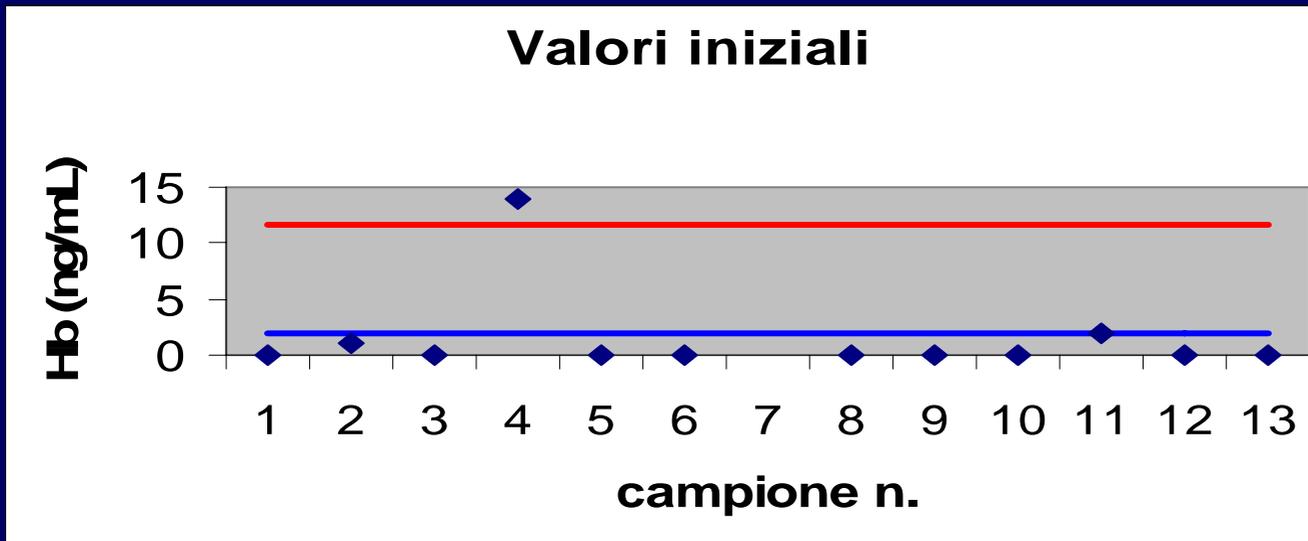
- il regime alimentare
- la capacità digestiva
- la velocità del transito
- flora batterica
- componenti anormali

La variabilità preanalitica legata al materiale biologico non si può standardizzare

Valutazione effetto matrice

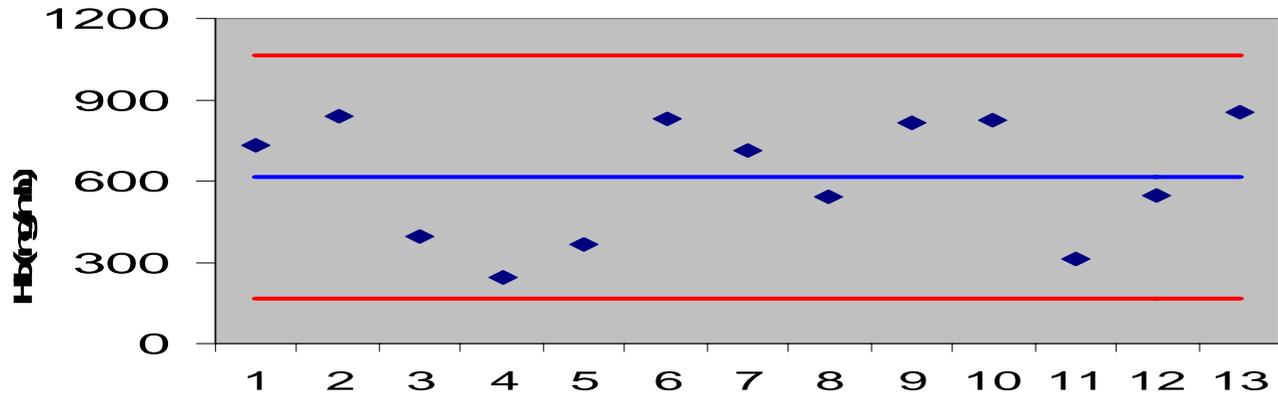


**Prove recupero
Campioni negativi.
Aggiunta di una
concentrazione teorica
costante 800 ng/mL.
Dosaggio con 2 metodi**



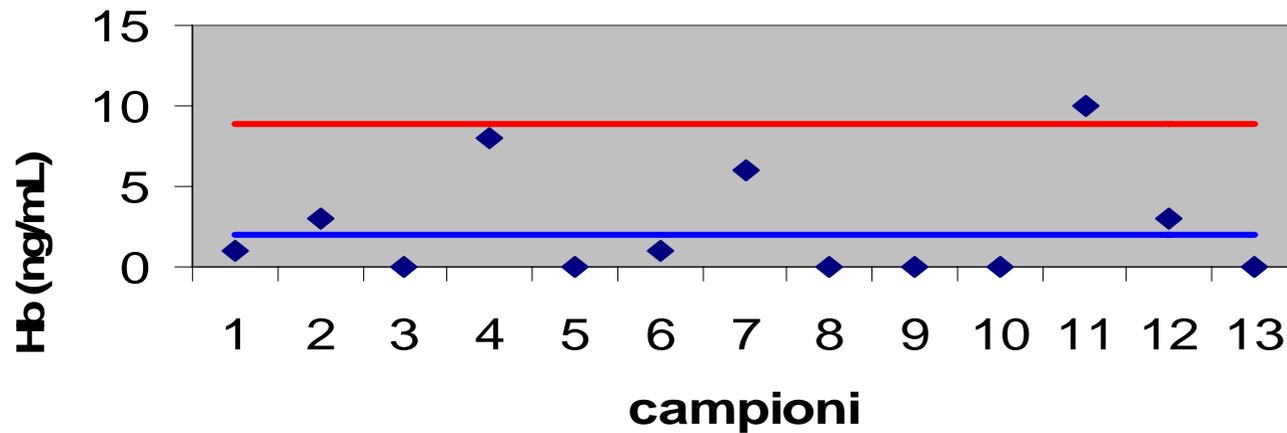
Valutazione effetto matrice

OC Sensor : Media 616+/-225. c.v.36.5
intervallo 246-854



Prove recupero
Campioni negativi.
Aggiunta di una
concentrazione teorica
costante 800 ng/mL.
Dosaggio con 2 metodi

Valori iniziali



Il Controllo di Qualità è quindi
l'unico mezzo che ci consente di
controllare l'affidabilità dei risultati.

Come si possono tenere sotto controllo gli errori:

Controllo di Qualità Interno
(Controllo di Qualità intralaboratorio)

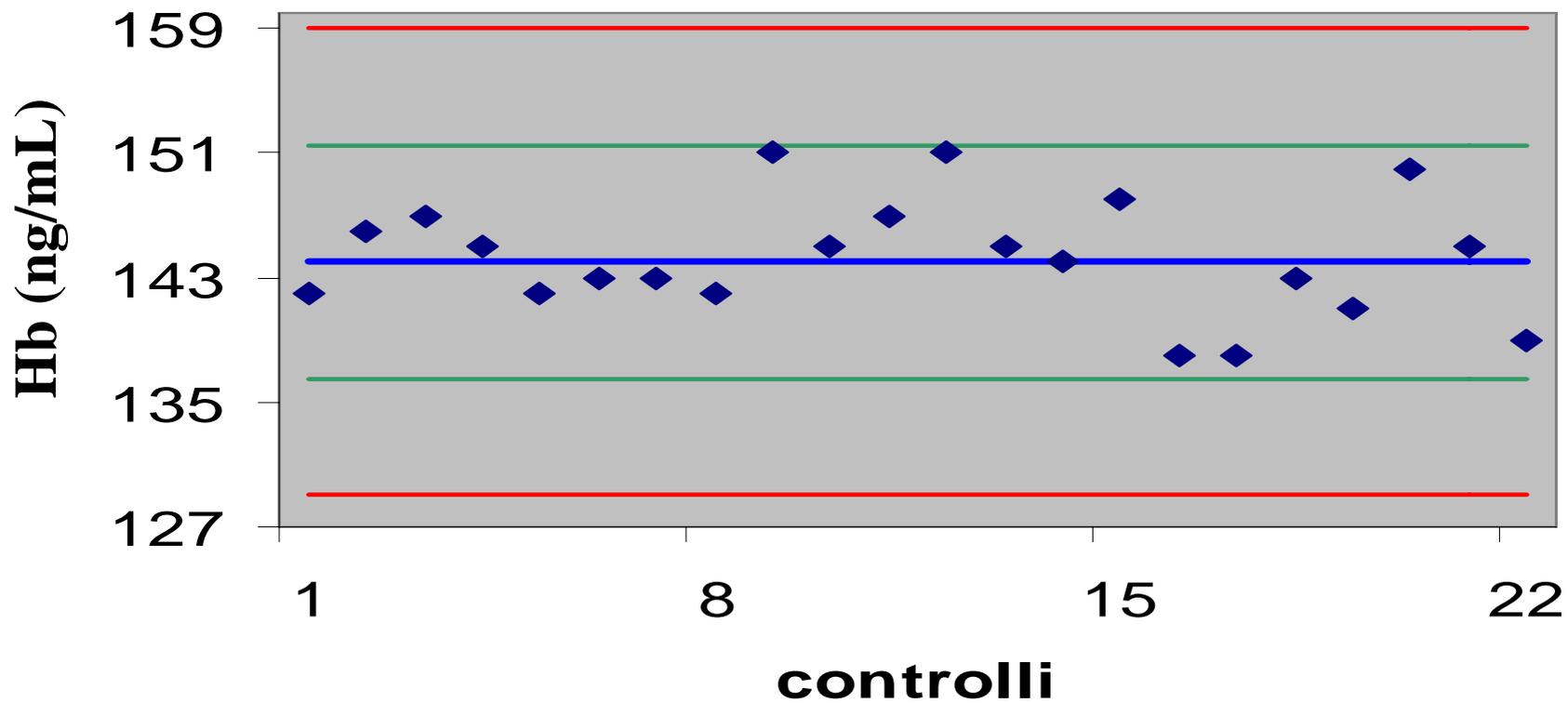
Controllo di Qualità Esterno
(VEQ Controllo di Qualità interlaboratorio)

Costruzione della Carta di Shewhart

- 20 ripetizioni del **Controllo Basso** nella stessa serie e si calcola la media e la deviazione standard
- 20 ripetizioni del **Controllo Alto** nella stessa serie e si calcola la media e la deviazione standard

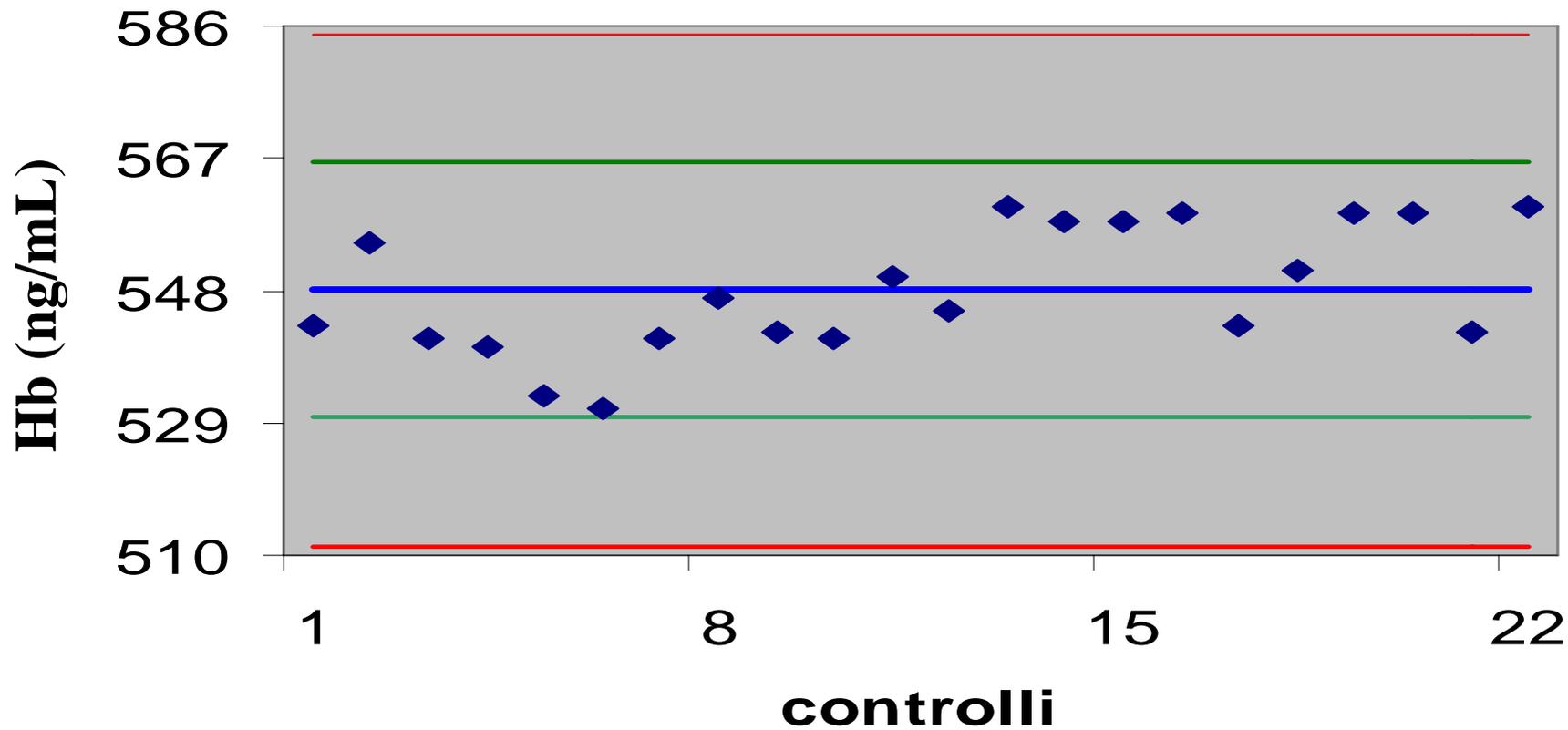
Carta Controllo. Livello 1

Media 144 ± 3.75 (cv=2.5)



Carta Controllo. Livello 2

Media 548 ± 9.18 (cv=1.67)



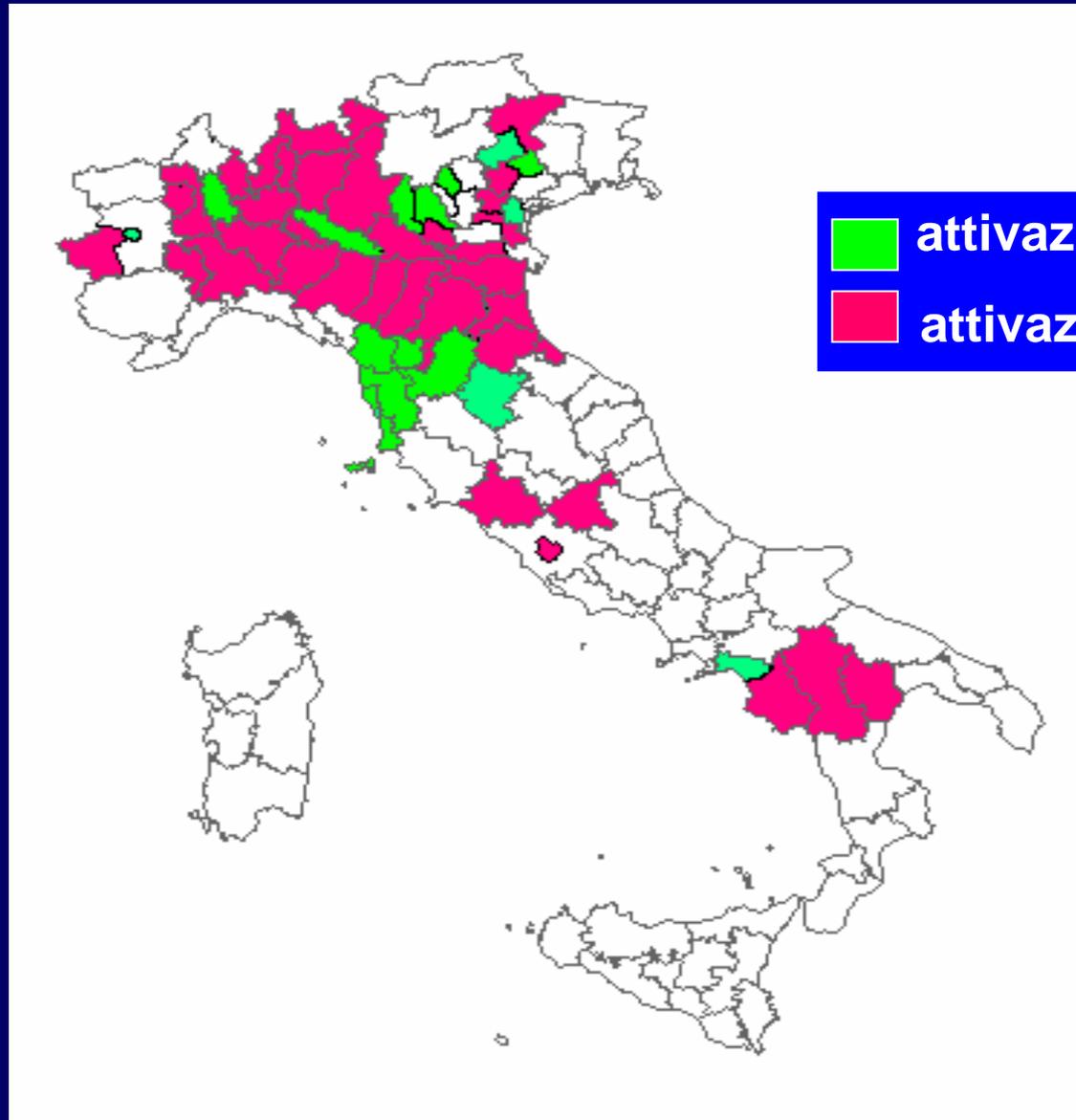
La **VEQ** (Valutazione Esterna Qualità) permette di valutare l'accuratezza dei risultati analitici, ma anche l'efficienza del laboratorio, in quanto l'accuratezza dipende da tutta una serie di fattori: apparecchi, reattivi, metodiche, ecc) che concorrono a fornire il risultato.

In Italia, le linee guida approvate dalla **Commissione Oncologica Nazionale** indicano che "*Metodiche efficaci per lo screening del cancro colo-rettale*" includono il **test per la ricerca del sangue occulto fecale (FOBT)** e la **sigmoidoscopia (FS)**.

Nel 2005 è nato il **GISCoR** (Gruppo Italiano dello Screening coloretale), un gruppo multidisciplinare che dovrebbe far acquisire la cultura di lavoro in team: organizzazione, laboratorio, approfondimenti, terapia e follow up .

Nel 2005 è nato l'**Osservatorio Nazionale Screening**, incaricato dal Dipartimento Prevenzione del Ministero della Salute del monitoraggio e promozione dei programmi di screening sul territorio nazionale (con sede al CSPO).

Programmi di screening colorettaie



• Intesa Stato Regioni 23 Marzo 2005

... gli screening vengano effettuati in condizioni nelle quali siano garantiti la qualità delle attrezzature e delle procedure

• Il FOBT è un esame laboratorio

... Requisiti Ministeriali per Accreditemento Laboratori Analisi

• Esecuzione CQi ad ogni seduta analitica

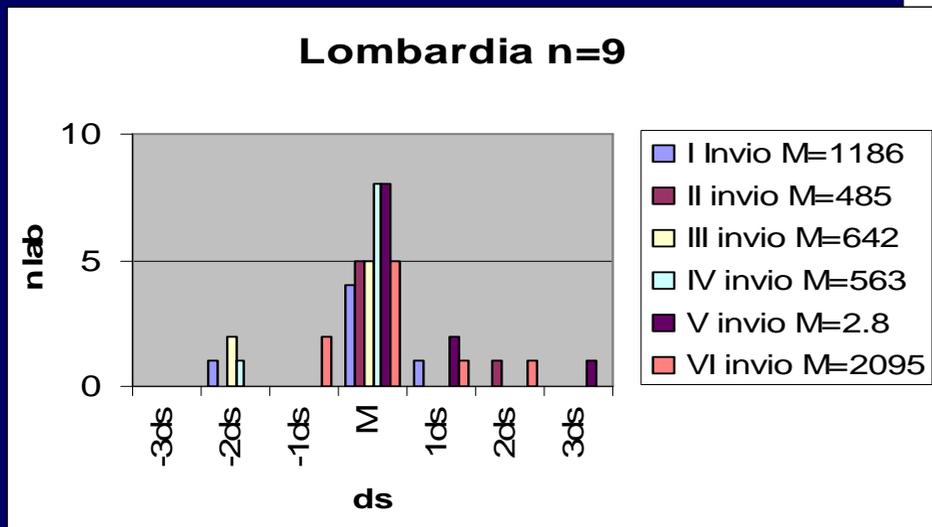
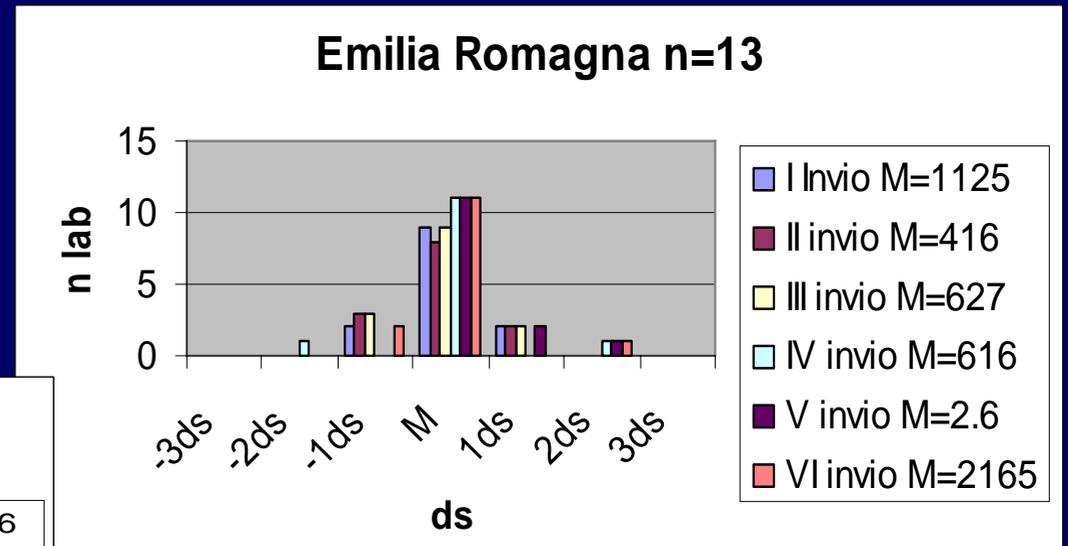
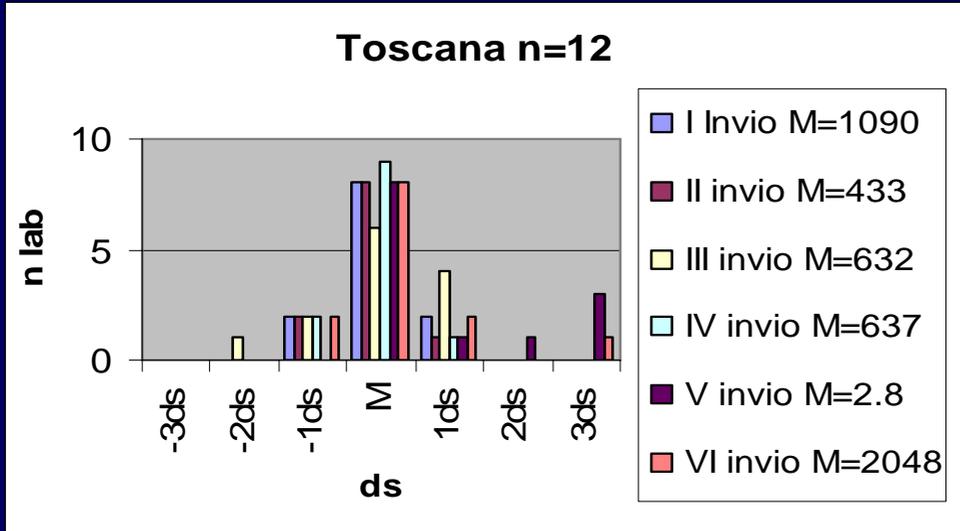
• **Partecipazione ad almeno 1 Ciclo VEQ**

• Criteri accettazione e di intervento per CQi / VEQ

• Registrazione Interventi Correttivi

Risultati per regione (VEQ R.T.)

regioni con più di 8 laboratori partecipanti



t.rubeca@cspo.it

www.giscor.it



Grazie dell'attenzione